



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS NA REGENERAÇÃO DOS TECIDOS
PERIODONTAIS**

Trabalho submetido por
Joana Isabel Pinho Pires
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS NA REGENERAÇÃO DOS TECIDOS
PERIODONTAIS**

Trabalho submetido por
Joana Isabel Pinho Pires
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Dra. Maria Luísa Lopes Amado Baptista
e coorientado por
Mestre Filipa Maria Bravo Pereira Jourdan

junho de 2019

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Maria Luísa Lopes Amado Batista, por toda a iluminação, motivação e ajuda na concretização deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Filipa Maria Bravo Pereira Jourdan, por toda a paciência, empenho e confiança depositada em mim.

À Prof. Doutora Maria Alzira Alfaiate Moreira Cavacas, por toda a disponibilidade, atenção e tempo dedicado.

Um especial agradecimento ao Instituto Universitário Egas Moniz, pela formação académica de excelência.

Ao meu pai, que me ensinou a lutar pelos meus objetivos com determinação, pelos princípios e educação que me incutiu, e pelo apoio emocional que me proporcionou.

À minha prima Lurdes, o meu maior pilar, por todo o apoio e incentivo, pela estabilidade financeira e emocional, por todo o carinho e positivismo que me transmitiu.

Aos meus amigos, presentes desde sempre, e em especial à minha parceira de box, que tornaram este projeto possível.

A todos, o maior e sincero obrigada.

Resumo

A descoberta das células estaminais mesenquimatosas e o conhecimento das suas propriedades e mecanismos inerentes, permitiu enfatizar a sua importância na área da medicina regenerativa, como terapêutica alternativa em diversas patologias. Estas células são acessíveis, prevalecem durante toda a vida e apresentam capacidade de autorrenovação e multipotência. A elevada prevalência da doença periodontal e a necessidade de reparação e regeneração dos tecidos, levou à investigação de terapias alternativas face às convencionais, que visam apenas cessar a progressão da periodontite. A presente revisão aborda conceitos e princípios recentes, relativos ao uso de células estaminais na regeneração dos tecidos periodontais, com o objetivo de concluir quais os tipos de células estaminais mais indicados para o restabelecimento da anatomia e função destes tecidos.

Palavras-Chave: Engenharia de Tecidos, Células Estaminais, Regeneração dos Tecidos Periodontais, Doença Periodontal

Abstract

The discovery of mesenchymal stem cells and the awareness of its properties and mechanisms, allowed to emphasize the importance of its applications in the area of regenerative medicine. These cells are available, remain during the entire life and present self-renewal and multipotent capacities. The high prevalence of periodontal disease and the need for repair and regeneration of the damaged tissues, led to the search for alternative therapies as opposed to the conventional ones that aim only to stop the progression of the periodontitis. The following revision, addresses the recent concepts and principals regarding the use of stem cells on the regeneration of periodontal tissue, with the purpose of find out which kind of stem cells are more indicated for the recovery of the anatomy and function of said tissues.

Keywords: Tissue Engineering, Stem Cells, Periodontal Regeneration, Periodontal Disease

Índice Geral

I. Introdução	13
II. Desenvolvimento	15
1. Anatomia dos Tecidos Periodontais	15
1.1. O Periodonto	15
1.1.1. Gengiva	16
1.1.2. Cimento Radicular	17
1.1.2.1. Cimento Radicular Acelular	17
1.1.2.2. Cimento Radicular Celular	17
1.1.3. Ligamento Periodontal	18
1.1.4. Osso Alveolar	19
2. Embriologia Dentária	20
3. Patologia dos Tecidos Periodontais	23
4. Definição e Classificação de Células Estaminais	24
4.1. Definição de Células Estaminais	24
4.2. Critérios de Caracterização de Células Estaminais	24
4.2.1. Autorrenovação	24
4.2.2. Diferenciação em Múltiplas Linhagens Celulares	24
4.3. Classificação de Células Estaminais	25
4.3.1. Células Estaminais Embrionárias	25
4.3.2. Células Estaminais Adultas	26
4.3.3. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas	27
5. Células Estaminais Dentárias	27
5.1. Células Estaminais Dentárias Epiteliais	28
5.2. Células Estaminais Dentárias Mesenquimatosas	28
5.2.1. Células Estaminais da Polpa Dentária (CEPD)	30
5.2.2. Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados (CEDDE)	32

5.2.3. Células Estaminais do Ligamento Periodontal (CELP)	33
5.2.4. Células Estaminais da Papila Apical (CEPA)	33
5.2.5. Células Estaminais do Folículo Dentário (CEFD)	34
5.2.6. Células Estaminais Mesenquimatosas da Gengiva (CEMG)	35
5.2.7. Células Estaminais Mesenquimatosas do Osso Alveolar (CEMOA)	36
5.2.8. Células Progenitoras do Gérmen Dentário (CPGD)	37
6. Células Estaminais Mesenquimatosas Não Dentárias	38
6.1. Células Estaminais Mesenquimatosas da Medula Óssea (CEMMO)	38
6.2. Células Estaminais Derivadas de Tecido Adiposo (CEDTA)	39
7. Transplante de Células Estaminais no Periodonto	39
7.1. Injeção de Células Estaminais sem Biomateriais	40
7.1.1. Engenharia de Cell Sheets (CS)	40
7.1.2. Agregados Celulares	41
7.2. Injeção de Células Estaminais com Biomateriais	41
7.2.1. Polímeros	42
7.2.1.1. Polímeros Naturais	42
7.2.1.1.1. Péptidos de Hidrogel	42
7.2.1.2. Polímeros Sintéticos	43
7.2.2. Cerâmica	43
7.2.3. Metal	43
7.2.4. Compósito	44
8. Isolamento de Células Estaminais	44
9. Reparação e Regeneração dos Tecidos Periodontais	45
9.1. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas	46
9.2. Células Estaminais da Polpa Dentária	46
9.3. Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados	49
9.4. Células Estaminais do Ligamento Periodontal	50

9.5. Células Estaminais da Papila Apical	52
9.6. Células Estaminais do Folículo Dentário.....	53
9.7. Células Estaminais Mesenquimatosas da Medula Óssea.....	54
9.8. Células Estaminais Derivadas de Tecido Adiposo.....	56
III. Conclusão	59
IV. Bibliografia	61

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama de uma secção de um molar permanente humano. À esquerda o dente está dividido em Coroa (porção superior) e Raiz (porção inferior). À direita, de cima para baixo: Esmalte, Dentina, Gengiva, Polpa Dentária, Ligamento Periodontal, Cimento, Osso Alveolar e Irrigação nervosa e sanguínea. 15

Figura 2 - Imagem histológica da Fase Tardia de Botão, aproximadamente na oitava semana de vida embrionária. Epitélio Oral (EO). Botão (B). Ectomesênquima (E). 21

Figura 3 - Imagem histológica da Fase de Sino. Estomódio (E), que corresponde à cavidade oral primitiva. Epitélio Oral (EO). Lâmina Dentária (LD). Folículo Dentário (FD). Epitélio Externo do Órgão de Esmalte (EE). Epitélio Interno do Órgão de Esmalte (EI). Retículo Estrelado (RE). Papila Dentária (PD). Ansa Cervical (AC). 22

Figura 4 - Desenho esquemático ilustrativo das fontes de células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecidos dentários humanos. Células Estaminais da Polpa Dentária (DPSCs). Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados (SHED). Células Estaminais do Ligamento Periodontal (PDLSCs). Células Estaminais da Papila Apical (SCAP). Células Estaminais do Folículo Dentário (DFPCs). Células Estaminais Mesenquimatosas da Gengiva (GMSCs). Células Estaminais Mesenquimatosas do Osso Alveolar (ABMSCs). Células Progenitoras do Gérmen Dentário (TGPCs). 30

Lista de Abreviaturas

BEH - Bainha Epitelial de Hertwig

CBCT – Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico

CD - Cluster de Diferenciação

CEDDE - Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados

CEDTA - Células Estaminais Derivadas de Tecido Adiposo

CEFD - Células Estaminais do Folículo Dentário

CELP - Células Estaminais do Ligamento Periodontal

CEMCUH - Células Estaminais Mesenquimatosas do Cordão Umbilical Humano

CEMG – Células Estaminais Mesenquimatosas da Gengiva

CEMMO - Células Estaminais Mesenquimatosas da Medula Óssea

CEMOA - Células Estaminais Mesenquimatosas do Osso Alveolar

CEPA - Células Estaminais da Papila Apical

CEPD - Células Estaminais da Polpa Dentária

CEPI - Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

CPGD - Células Progenitoras do Gérmen Dentário

CS - Cell Sheets

EDA - Ectodisplasina A

FCDP - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

FCF - Fator de Crescimento Fibroblástico

FCI - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

HLA Classe II - Sistema Antígeno Leucocitário Classe II

HydM - HydroMatrix

IG – Índice Gengival

IP – Índice de Placa

MG – Margem Gengival

Mm - milímetros

NIP – Nível de Inserção Periodontal

°C - Graus Celsius

OCA – Osso Cortical Autógeno

Oct-4 - Fator de Transcrição de Ligação ao Octâmero 4

PFV – Proteína Fluorescente Verde

POM - Proteína Óssea Morfogenética

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PS – Profundidade de Sondagem

PSHH - Proteínas Sonic Hedgehog

RC – Recessão Gengival

RTG - Regeneração Tecidual Guiada

Runx2 - Fator de Transcrição 2 relacionado com Runt

SSF – Sistema de Separação por Fluorescência

SSM – Sistema de Separação Magnético

STRO-1 – Marcador Celular de Precusores do Estroma

TGF-β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

WNT – Via de Sinalização Wingless

β-FTC - Beta Fosfato Tricálcico

I. Introdução

Langer e Vacanti (1993) propõem um novo conceito relacionado com a Medicina Regenerativa, a “Engenharia de Tecidos”, que visa o restabelecimento de tecidos com recurso a três componentes: células, matrizes e fatores de crescimento.

Os procedimentos regenerativos dos tecidos periodontais usados na prática clínica de forma intensiva apresentam, de um modo geral, bons resultados clínicos (Botelho, Cavacas, Machado, & Mendes, 2017). São exemplos: regeneração tecidular guiada (RTG), tratamento com fatores de crescimento, aplicação de proteínas derivadas da matriz do esmalte, entre outros (Shang et al., 2017).

A descoberta das células estaminais mesenquimatosas e o conhecimento das suas propriedades e mecanismos inerentes, permitiu enfatizar a sua importância na área da medicina regenerativa. Estas células são acessíveis, prevalecem durante toda a vida e apresentam capacidade de multipotência (Botelho et al., 2017). A terapia periodontal com células estaminais visa a completa remodelação dos tecidos periodontais, o que implica a reconstrução do osso alveolar, a indução de cementogénese ao longo da superfície radicular e a inserção de novas fibras de ligamento periodontal devidamente orientadas (Xu et al., 2018).

O sucesso da regeneração periodontal com células estaminais depende de diversos fatores: adequada irrigação sanguínea das células progenitoras, sinais moleculares específicos que estimulem a diferenciação celular, neogénese dos tecidos e existência de uma matriz tridimensional que mimetize a matriz extracelular (Han, Menicanin, Gronthos, & Bartold, 2014). O sucesso do tratamento depende também do conhecimento de mecanismos que influenciam o processo de regeneração: gestão de eventos crónicos inflamatórios, controlo de infeções bacterianas e redução de danos tecidulares durante a intervenção cirúrgica (Botelho et al., 2017).

O objetivo do tratamento periodontal cirúrgico e não cirúrgico é prevenir a progressão da doença periodontal através da remoção de bactérias patogénicas e tecido inflamatório.

Estes procedimentos não apresentam capacidade de restaurar a forma inicial dos tecidos (Bassir et al., 2016; Xu et al., 2018).

Esta limitação do tratamento da doença periodontal tornou essencial a procura de técnicas com capacidade de restabelecer a anatomia e função do periodonto na área da medicina regenerativa (Iwata et al., 2014).

II. Desenvolvimento

1. Anatomia dos Tecidos Periodontais

1.1. O Periodonto

O periodonto é o conjunto de tecidos que suporta e envolve o dente. É constituído pela porção gengival, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar (Figura 1) (Dentino, Lee, Mailhot, & Hefti, 2013).

Cada um dos componentes periodontais apresenta uma estrutura especializada com características específicas que definem a sua função biológica. A adequada função do periodonto é alcançada devido à integridade estrutural e correta interação entre cada um dos componentes (Nanci & Bosshardt, 2006).

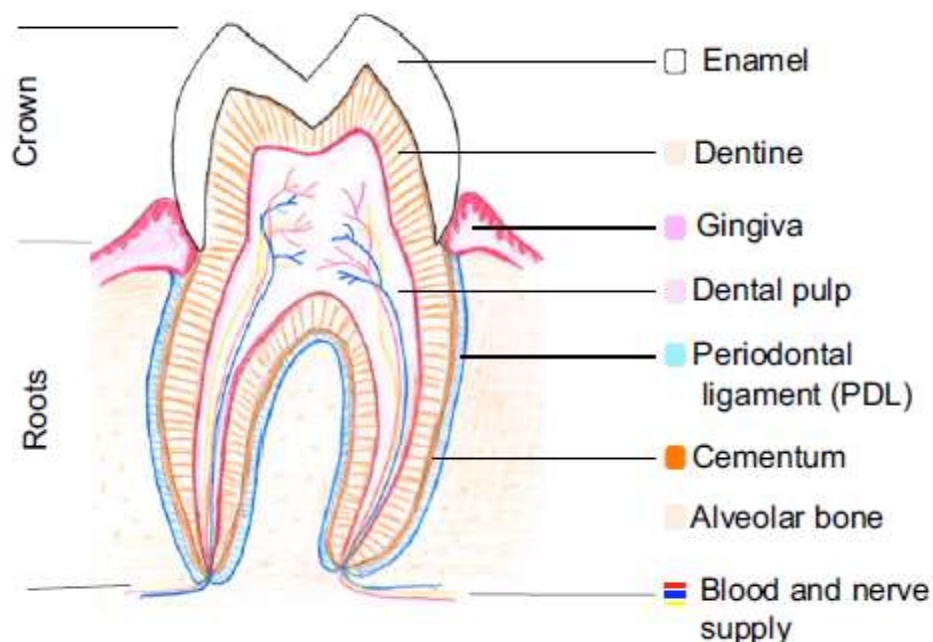


Figura 1 - Diagrama de uma secção de um molar permanente humano. À esquerda o dente está dividido em Coroa (porção superior) e Raiz (porção inferior). À direita, de cima para baixo: Esmalte, Dentina, Gengiva, Polpa Dentária, Ligamento Periodontal, Cimento, Osso Alveolar e Irrigação nervosa e sanguínea.

Imagem gentilmente cedida por Paul T. Sharpe, 2016.

1.1.1. Gengiva

A gengiva é o tecido que envolve os dentes. O tecido gengival é composto por uma porção epitelial e por tecido conjuntivo, ou lâmina própria, que está conectado ao osso alveolar. Tem função de barreira, separando o compartimento periodontal da cavidade oral (Tang, Li, Xie, & Jin, 2011).

O tecido epitelial gengival está dividido em três compartimentos funcionais: epitélio gengival externo, epitélio do sulco e epitélio de união. O tecido conjuntivo é formado pelo compartimento de tecido conjuntivo superficial e profundo (Nanci & Bosshardt, 2006).

O epitélio gengival externo é queratinizado, de modo a suportar as forças mastigatórias e outras forças traumáticas a que o dente é sujeito. As células da superfície queratinizada, maioritariamente queratinócitos, estão em constante reposição através do estrato basal epitelial. Para além dos queratinócitos existem em menor quantidade: células de Langerhans, células de Merkel, melanócitos e células inflamatórias (Han et al., 2014).

O epitélio do sulco faz a transição entre o epitélio gengival externo e o epitélio de união. É não queratinizado e compõe o sulco gengival (Dabija-Wolter, Bakken, Cimpan, Johannessen, & Costea, 2013).

O epitélio de união forma a base do sulco gengival e promove o selamento do compartimento inferior dos tecidos periodontais. A sua integridade é essencial para a manutenção da saúde periodontal. A doença periodontal é estabelecida quando a sua estrutura é lesada (Nanci & Bosshardt, 2006).

O tecido conjuntivo ou lâmina própria é o componente predominante do tecido gengival. É constituído por fibroblastos, células do sistema imunitário, células endoteliais, vasos sanguíneos e linfáticos, e uma matriz extracelular composta por proteínas colagenosas e não colagenosas (Han et al., 2014).

1.1.2. Cimento Radicular

O cimento radicular é um tipo de tecido conjuntivo mineralizado e avascular que reveste a raiz dos dentes. O seu conteúdo inorgânico é constituído maioritariamente por hidroxiapatite e perfaz cerca de 45 a 50%. O conteúdo orgânico é de 50 a 55% e é constituído maioritariamente por fibras de colagénio (Han et al., 2014).

Existem dois tipos de cimento radicular: acelular ou primário e celular ou secundário. São classificados com base na presença ou ausência de células e na origem das fibras de colagénio da matriz extracelular (Nanci & Bosshardt, 2006).

1.1.2.1. Cimento Radicular Acelular

O cimento acelular ou primário cobre os 2/3 cervicais da superfície radicular (Han et al., 2014). É o primeiro a ser formado antes da erupção dentária. Apresenta um desenvolvimento lento e é considerado acelular (Nanci & Bosshardt, 2006).

O cimento acelular liga a superfície radicular ao alvéolo dentário através das fibras principais do ligamento periodontal, designadas por Fibras de Sharpey, que nele se inserem (Nanci & Bosshardt, 2006).

1.1.2.2. Cimento Radicular Celular

O cimento celular ou secundário, cobre o 1/3 médio, apical e zonas de furca da superfície radicular. É produzido após a erupção dentária, como um tecido de reparação que preenche defeitos de reabsorção e fraturas radiculares. O seu desenvolvimento é considerado rápido e é menos mineralizado que o cimento primário. É caracterizado por possuir uma organização heterogénea das fibras de colagénio e pela presença de células (Nanci & Bosshardt, 2006).

O cimento celular desempenha uma função adaptativa, permitindo o movimento dentário nas arcadas durante o tratamento ortodôntico (Han et al., 2014).

1.1.3. Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é um tipo de tecido conjuntivo especializado que recobre a superfície radicular do dente e une o cemento radicular à lâmina dura do osso alveolar (Dean, 2017).

A sua espessura varia entre 0.15 e 0.38 milímetros (mm), diminui com a idade e aumenta com a função mastigatória. A porção mais estreita está localizada entre o 1/3 médio e o 1/3 apical da superfície radicular (Nanci & Bosshardt, 2006). É ricamente vascularizado, característica refletida na elevada taxa de renovação dos elementos celulares e extracelulares que o constituem (Han et al., 2014).

O ligamento periodontal promove a estabilidade mecânica, suporta os dentes no alvéolo e absorve as forças mastigatórias a que os dentes e o osso alveolar estão sujeitos (Jong, Bakker, Everts, & Smit, 2017). Apresenta ainda outras funções: sensorial, essencial para o correto posicionamento dos maxilares durante os movimentos mastigatórios; manutenção da homeostase e reparação dos tecidos que são danificados por traumas ou patologia periodontal (Dean, 2017).

À semelhança de outros tecidos conjuntivos, o ligamento periodontal é constituído por elementos celulares, fibras colagenosas e não colagenosas, vasos sanguíneos e linfáticos. As células mais abundantes são os fibroblastos e, em menor quantidade, osteoblastos, osteoclastos, restos epiteliais de Malassez, monócitos, macrófagos, células mesenquimatosas indiferenciadas ou pluripotentes, cementoblastos e cementoclastos (Han et al., 2014).

A resiliência estrutural do ligamento periodontal é oferecida pelas fibras de colagénio mais abundantes: tipo I e tipo III, com menor contribuição destas últimas (Jong et al., 2017). Os tipos de colagénio menos abundantes são IV, V, VI e XII, que desempenham a função de manutenção estrutural e regeneração dos tecidos, durante os movimentos dentários (Dean, 2017).

A maioria das fibras de colagénio do ligamento periodontal estão situadas na porção média não mineralizada, organizadas de forma estruturada, onde se designam por fibras principais do ligamento periodontal. São classificadas consoante a sua localização e orientação relativamente à superfície radicular (Jong et al., 2017).

As fibras principais do ligamento periodontal estão divididas em três grupos: dentogengivais, transeptais e dentoalveolares. As fibras dentogengivais estendem-se numa direção oblíqua desde o cimento até à gengiva interproximal. As fibras transeptais estendem-se interproximalmente sobre a crista alveolar e inserem-se no cimento do dente adjacente. As fibras dentoalveolares representam a maioria das fibras do ligamento periodontal e estendem-se desde a porção cervical da superfície radicular até à crista alveolar em direção oblíqua. Neste último grupo estão incluídas as fibras da crista alveolar, fibras horizontais, fibras oblíquas, fibras apicais e fibras interradiculares (em dentes multirradiculares) (Jong et al., 2017).

1.1.4. Osso Alveolar

O osso alveolar constitui o processo alveolar, que está ligado ao osso basal da mandíbula e maxila e que contém os alvéolos dentários (Han et al., 2014). É constituído por osso compacto e osso esponjoso. O osso compacto engloba as tábuas corticais externas (vestibular e lingual ou palatina) e o osso alveolar propriamente dito. O osso esponjoso promove o suporte alveolar (Nanci & Bosshardt, 2006).

A organização estrutural das paredes do alvéolo dentário varia ao longo da superfície radicular. O osso alveolar está em constante remodelação devido às forças contínuas a que os dentes estão sujeitos (Nanci & Bosshardt, 2006).

O tecido ósseo é composto por componentes celulares, proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento, cristais de cálcio sob a forma de hidroxiapatite e um sistema vascular complexo. As células ósseas representam, aproximadamente, um décimo do volume total ósseo e incluem células osteo-progenitoras de origem mesenquimatosa, osteoblastos, osteócitos, células de origem hematopoiética e osteoclastos (Polo-Corrales, Latorre-Esteves, & E. Ramirez-Vick, 2014).

Os pré-osteoblastos são células progenitoras de origem mesenquimatosa. Estão localizados no periósteo, endósteo e canais de Harvers. Estes são estimulados por diversos fatores de crescimento: proteínas ósseas morfogenéticas (POM), fator de transformação do crescimento beta (FTC- β), fator de crescimento fibroblástico (FCF), fator de crescimento semelhante à insulina (FCI), fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP) e interleucinas. Estes mecanismos levam à migração dos pré-osteoblastos para localizações específicas onde proliferam e se diferenciam em osteoblastos (Polo-Corrales et al., 2014).

Os componentes da matriz extracelular são majoritariamente proteínas colagenosas e não colagenosas. Estas últimas incluem as glicoproteínas: fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina, que modulam o processo de mineralização óssea, e as proteoglicanas que promovem a resistência dos tecidos a forças compressivas e promovem a libertação fatores de crescimento. As proteínas colagenosas constituem 90% do volume total das proteínas da matriz extracelular, dos quais 97% são colagénio tipo I com grupos menores de tipo III, V e XIII (Polo-Corrales et al., 2014).

2. Embriologia Dentária

Os dentes são órgãos com origem ectomesenquimatosa (Balic, 2018). São constituídos pela polpa dentária e por três tecidos mineralizados: dentina, cemento e esmalte. A polpa dentária é um tipo de tecido conjuntivo mole, não mineralizado e vascularizado que apresenta funções nutritivas, sensoriais e imunológicas. O esmalte tem origem epitelial e a polpa, a dentina e o cemento têm origem mesenquimatosa (Stevens et al., 2008).

A odontogénese começa aproximadamente na sexta semana de gestação. É induzida pelo tecido epitelial dentário e controlada por interações recíprocas entre este e o tecido mesenquimatoso através de várias vias de sinalização: FCF, POM, proteínas sonic hedgehog (PSHH), via de sinalização wingless (WNT) e ectodisplasina A (EDA) (Balic, 2018).

O início da odontogênese é marcado por um espessamento epitelial na zona do futuro gérmen dentário que origina a lâmina dentária. De seguida, ocorre a invaginação do epitélio no tecido mesenquimatoso subjacente. Os estágios seguintes são marcados pela proliferação e morfodiferenciação de células epiteliais dando origem a uma sequência de etapas evidenciadas pela transição em diversas formas: botão, chapéu e sino (Balic, 2018).

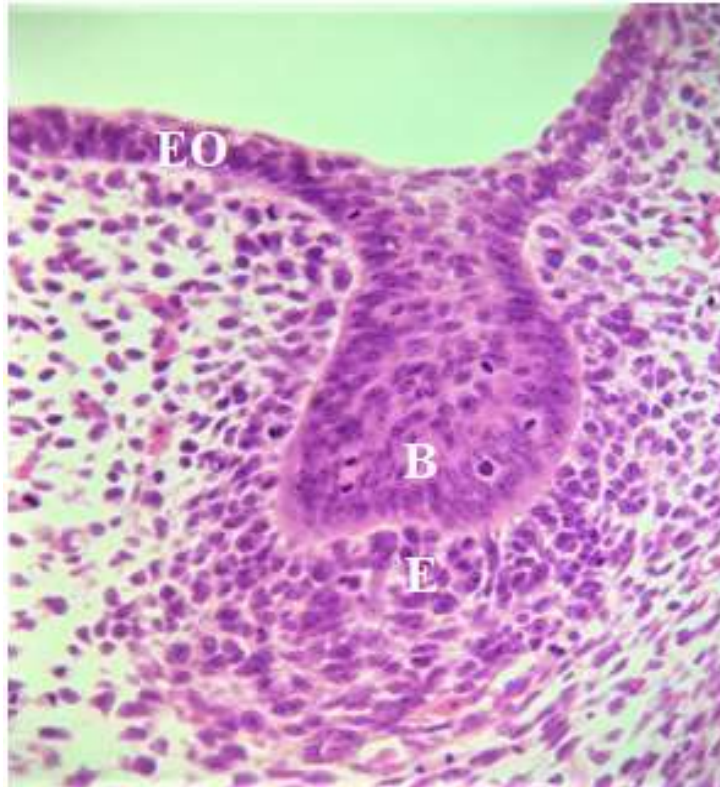


Figura 2 - Imagem histológica da Fase Tardia de Botão, aproximadamente na oitava semana de vida embrionária. Epitélio Oral (EO). Botão (B). Ectomesênquima (E).

Na fase de sino, a porção externa do folículo dentário é denominada epitélio externo de esmalte e está conectada à lâmina dentária. A porção interna, adjacente à papila, é denominada epitélio interno do esmalte. Os pré-ameloblastos desenvolvem-se a partir do epitélio interno de esmalte e os odontoblastos a partir da papila dentária (Figura 3) (Ulmer, Winkel, Kohorst, & Stiesch, 2010).

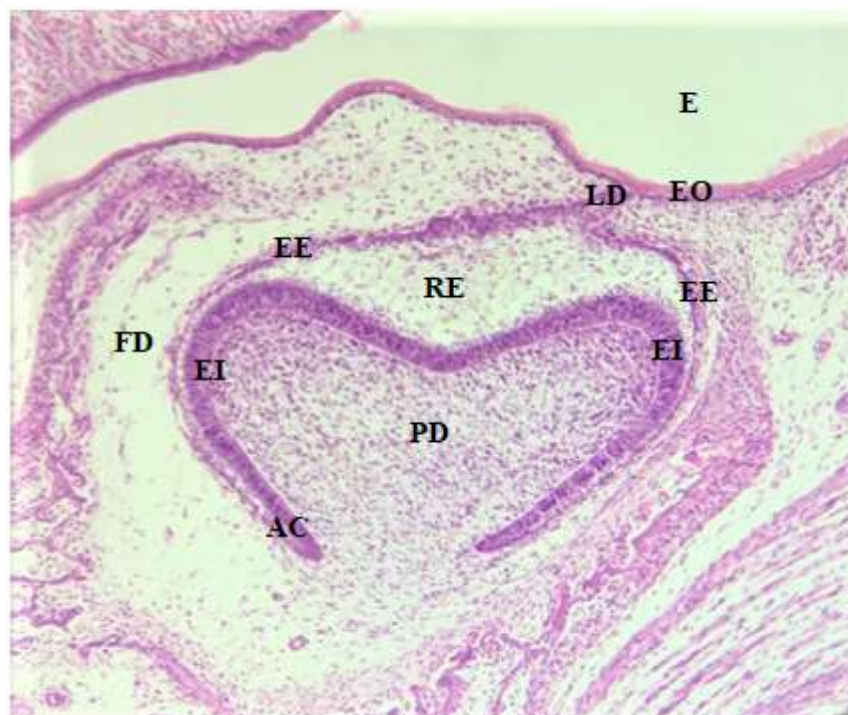


Figura 3 - Imagem histológica da Fase de Sino. Estomódio (E), que corresponde à cavidade oral primitiva. Epitélio Oral (EO). Lâmina Dentária (LD). Folículo Dentário (FD). Epitélio Externo do Órgão de Esmalte (EE). Epitélio Interno do Órgão de Esmalte (EI). Retículo Estrelado (RE). Papila Dentária (PD). Ansa Cervical (AC).

Nesta fase, é possível observar a ansa cervical, na região em que os epitélios interno e externo se unem. Esta estrutura constitui um nicho de células estaminais epiteliais e é composta pelos epitélios de esmalte e por células do retículo estrelado (Figura 3) (Balic & Thesleff, 2015).

Este nicho de células estaminais epiteliais permanece ativo até ao início da formação radicular, que coincide com a perda do retículo estrelado e consequente perda das células estaminais epiteliais. Sabe-se também que durante a erupção dentária o compartimento epitelial é perdido através de mecanismos celulares, como apoptose. Estes dois fenómenos explicam a incapacidade regenerativa do esmalte dentário (Balic, 2018).

A fase tardia de sino é caracterizada pela diferenciação celular e produção de matriz mineralizada – esmalte e dentina, que formam a coroa do futuro dente (Balic, 2018).

Após o término da formação da coroa dentária, a ansa cervical origina a Bainha Epitelial de Hertwig (BEH), responsável pelo desenvolvimento da raiz (Balic & Thesleff, 2015).

As fases finais do desenvolvimento radicular ocorrem durante e após a erupção dentária e são caracterizadas pelo alongamento da raiz e desenvolvimento dos tecidos periodontais, que ligam o dente ao osso alveolar (Balic, 2018).

Todos os constituintes do periodonto têm origem no folículo dentário, a camada mesenquimatosa superficial que envolve o epitélio e a papila dentária, durante o desenvolvimento dentário. Quando termina a formação da coroa, dá-se o início da formação radicular e conseqüentemente, ocorre a diferenciação das células do folículo dentário em fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos (Jong et al., 2017).

3. Patologia dos Tecidos Periodontais

A doença periodontal é considerada a sexta doença com maior prevalência a nível mundial (Bassir et al., 2016). Causa danos irreversíveis nos dentes, tecidos envolventes e na sua função. Quando não é realizado tratamento leva à perda dentária (Xu et al., 2018).

As lesões provocadas pela gengivite e periodontite são resultantes na maioria dos casos, por indução do biofilme. A inflamação limitada ao compartimento gengival resulta de uma simbiose bem balanceada entre os microorganismos e os tecidos periodontais do hospedeiro, sendo nesta fase reversível (Dentino et al., 2013). Quando o mecanismo de simbiose falha e a destruição dos tecidos é prolongada às restantes estruturas do periodonto, este torna-se permanentemente danificado e ocorre perda de inserção. Está estabelecida a doença periodontal (Iwata, Yamato, Ishikawa, Ando, & Okano, 2014).

As bactérias são essenciais para o desenvolvimento da doença periodontal. No entanto, esta pode ser desencadeada por diversos fatores, sendo considerada uma doença multifatorial (Nanci & Bosshardt, 2006).

Uma das primeiras alterações estruturais no estabelecimento da doença periodontal é a migração apical do epitélio de união. Ocorre consequentemente, formação de um epitélio de união longo e formação da bolsa periodontal (Nanci & Bosshardt, 2006).

4. Definição e Classificação de Células Estaminais

4.1. Definição de Células Estaminais

As células indiferenciadas com potencial de diferenciação em células especializadas de diversos tecidos são designadas por células estaminais. Apresentam duas características principais: capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares (Volponi & Sharpe, 2013).

4.2. Critérios de Caracterização de Células Estaminais

4.2.1. Autorrenovação

As células estaminais podem dividir-se de duas formas distintas: simétrica ou assimetricamente. Na divisão simétrica originam duas células estaminais com propriedades de diferenciação semelhantes à célula-mãe: processo de autorrenovação. Na divisão assimétrica originam duas células estaminais distintas, em que uma apresenta capacidade de diferenciação semelhante à célula-mãe e a outra apresenta capacidade de diferenciação numa linhagem específica (El-Sayed & Dörfer, 2016).

4.2.2. Diferenciação em Múltiplas Linhagens Celulares

As células estaminais apresentam capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares: osteoblástica, adipogénica, condrogénica, endotelial e neural. A linhagem depende das condições e sinais moleculares a que as células são sujeitas em cultura (El-Sayed & Dörfer, 2016).

4.3. Classificação de Células Estaminais

As células estaminais são classificadas de acordo com o potencial de diferenciação, local de colheita e origem (Chandki, Kala, Banthia, & Banthia, 2012).

De acordo com o potencial de diferenciação, as células estaminais podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. As células totipotentes têm capacidade de diferenciação em qualquer tipo de célula no organismo, à semelhança de um embrião. As células pluripotentes originam qualquer tipo de célula das três camadas germinativas: ectoderme, endoderme e mesoderme, à semelhança de uma célula embrionária. As células multipotentes podem originar várias linhagens celulares da mesma camada germinativa, consoante o tecido de origem. As células oligopotentes podem diferenciar-se em diferentes tipos de células dentro de uma linhagem específica. Por último, as células unipotentes podem diferenciar-se em apenas um tipo celular (Neel, Chrzanowski, Salih, Kim, & Knowles, 2014).

De acordo com o local de colheita, as células estaminais podem classificar-se como: autólogas, quando são obtidas e transplantadas no mesmo indivíduo; alogénicas, se obtidas de um dador da mesma espécie do recetor; xenogénicas, se obtidas de um dador de uma espécie diferente do recetor e singénicas ou isogénicas quando obtidas de um indivíduo geneticamente idêntico ao recetor, como por exemplo gémeos, clones ou indivíduos consanguíneos (Chandki et al., 2012).

De acordo com a sua origem, as células estaminais podem também ser classificadas em células estaminais embrionárias, células estaminais adultas ou somáticas e células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI) (Han et al., 2014).

4.3.1. Células Estaminais Embrionárias

As células estaminais embrionárias são uma população de células com elevado potencial na área da medicina regenerativa. Podem ser mantidas em cultura durante períodos de tempo indefinidos, mantendo o potencial de diferenciação (Neel et al., 2014).

As células estaminais embrionárias podem originar todos os tipos de células somáticas e dividir-se de forma ilimitada. A sua colheita pode ser efetuada nas fases iniciais do blastocisto, no quarto dia de desenvolvimento embrionário. Neste procedimento, o trofoblasto do blastocisto é destruído. Os embrioblastos, a parte do blastocisto com interesse para a área de investigação, são mantidos. Em termos éticos, esta forma de obtenção de células estaminais é controversa, na medida em que para ser efetuada, é necessário destruir um embrião humano em desenvolvimento (Ulmer et al., 2010).

4.3.2. Células Estaminais Adultas

As células estaminais adultas ou somáticas podem ser obtidas através da colheita de amostras de tecido. Apresentam proliferação limitada. Podem ser unipotentes, bipotentes ou multipotentes. Quando são unipotentes ou bipotentes podem diferenciar-se em células pertencentes ao tecido de origem. Quando são multipotentes podem diferenciar-se em células da mesma camada germinativa que o tecido de origem (Ulmer et al., 2010).

Estas células apresentam funções específicas no organismo: manutenção da homeostase e auxílio na reparação e regeneração dos tecidos (Bartold & Gronthos, 2017).

As fontes para obtenção de células estaminais dentárias adultas são: dentes extraídos e restos de tecido que o envolvem. A cultura celular deve ser efetuada em laboratório. Após o correto isolamento, a sua expansão é facilmente obtida. Podem ser criopreservadas por um período longo de tempo, sem que percam as capacidades de diferenciação (Volponi & Sharpe, 2013).

Apesar de exibirem um potencial de proliferação e diferenciação mais restrito em relação às células estaminais embrionárias, apresentam diversas vantagens, nomeadamente, facilidade na recolha e acesso, imunocompatibilidade e não estão envolvidas em questões éticas que impeçam o seu uso (Han et al., 2014).

Dadas as limitações relativas à capacidade de diferenciação, tornou-se crucial procurar uma fonte de células estaminais pluripotentes de origem não embrionária. Surgem desta forma as CEPI, originárias de células estaminais adultas (Han et al., 2014).

4.3.3. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

As CEPI são semelhantes às células estaminais embrionárias em diversos parâmetros: morfologia, expressão génica, potencial de diferenciação e proliferação (Han et al., 2014). São células estaminais somáticas reprogramadas para um estágio de célula estaminal embrionária, através da expressão forçada de fatores de transcrição embrionários (Galkowski, Ratajczak, Kocki, & Darzynkiewicz, 2017).

Apesar da vantagem ética perante as células estaminais embrionárias, as CEPI apresentam elevada instabilidade genómica e potencial tumorigénico. Ainda não foram determinados quais os efeitos adversos que podem suceder das mutações ocorridas na sequência da indução de células somáticas em CEPI. Consequentemente, até à data, não é seguro efetuar ensaios clínicos em humanos (Yoshihara, Hayashizaki, & Murakawa, 2016).

É importante, através de mais estudos clínicos e pré-clínicos, alcançar os meios de manipulação genética que permitam a indução de células estaminais adultas em CEPI sem que ocorram efeitos secundários nocivos no seu genoma (Han et al., 2014).

5. Células Estaminais Dentárias

As células estaminais dentárias derivam da crista neural. São uma população de células estaminais adultas com capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares (Chalisserry, Nam, Park, & Anil, 2017).

5.1. Células Estaminais Dentárias Epiteliais

As células estaminais dentárias epiteliais foram identificadas pela primeira vez em incisivos de ratos (Smith & Warshawsky, 1975). Mais tarde, comprovou-se que teriam a capacidade de originar todo o tipo de tecidos epiteliais presentes nos dentes (Balic, 2018). Em oposição aos dentes humanos, os incisivos dos roedores crescem de forma contínua ao longo de toda a sua vida, não existindo perda das estruturas que constituem os nichos de células estaminais epiteliais (Ulmer et al., 2010).

Até à data, os conceitos concernentes à regulação dos mecanismos das células estaminais epiteliais dentárias não são claros, para que possam ser compreendidos e corretamente usados em investigações clínicas (Balic, 2018).

5.2. Células Estaminais Dentárias Mesenquimatosas

As células estaminais mesenquimatosas foram identificadas pela primeira vez em 1966, na medula óssea. Os autores definiram-nas como uma população de células mesenquimatosas adultas, organizadas de forma hierárquica e com potencial de diferenciação em tecidos especializados de pelo menos uma linhagem mesenquimatosas: osso, cartilagem, tecido adiposo, músculo e células neurais (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, & Petrakova, 1966).

Atualmente, a identificação, caracterização e isolamento de células estaminais são efetuados através de marcadores celulares. O marcador celular dos precursores do estroma (STRO-1) é o mais conhecido marcador das células estaminais mesenquimatosas. No entanto, a sua expressão diminui consideravelmente durante a cultura celular. Para além deste, existem outros marcadores que definem uma população de células estaminais mesenquimatosas (Ulmer et al., 2010).

A *International Society for Cellular Therapy* estabeleceu 3 critérios mínimos para a identificação de uma população de células estaminais mesenquimatosas:

- i. capacidade de aderência a superfícies plásticas em meio de cultura;

- ii. expressão positiva dos marcadores moleculares cluster de diferenciação 73 (CD73), CD90 e CD105 e expressão negativa de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79- α ou CD19 e sistema antígeno leucocitário classe II (HLA classe II);
- iii. potencial de diferenciação *in vitro* em pelo menos três linhagens celulares: osteogénica, condrogénica e adipogénica (Han et al., 2014).

Para além dos critérios acima indicados e para uma caracterização mais rigorosa, as células estaminais mesenquimatosas devem ainda: possuir capacidade de formar populações através de divisões sucessivas e manter o potencial de autorrenovação quando transplantadas de forma sucessiva *in vivo* (Bartold & Gronthos, 2017).

As células estaminais mesenquimatosas dentárias foram inicialmente isoladas da polpa dentária (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000). Posteriormente foram descobertas em: dentes decíduos esfoliados (Miura et al., 2003), ligamento periodontal (Seo et al., 2004), papila apical (Sonoyama et al., 2006), folículo dentário (Morsczeck et al., 2005), tecido gengival (Q. Zhang et al., 2009), osso alveolar (Matsubara et al., 2005), e em gérmes dentários (Ikeda et al., 2008) (Figura 4).

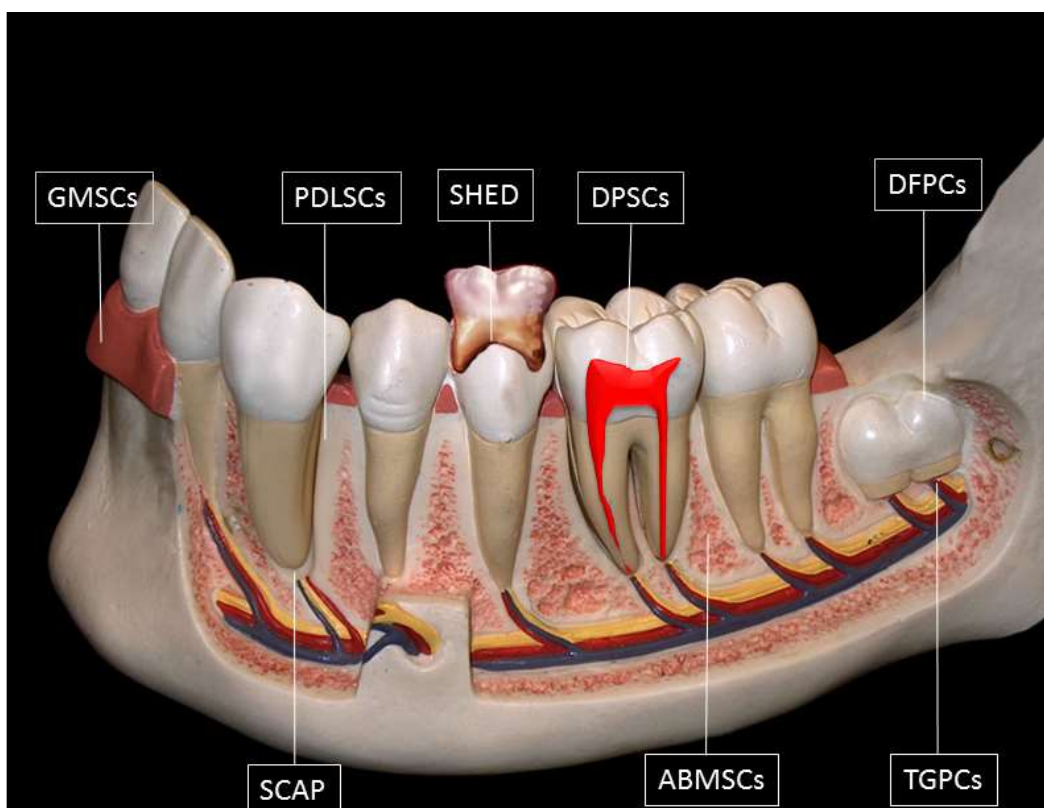


Figura 4 - Desenho esquemático ilustrativo das fontes de células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecidos dentários humanos. Células Estaminais da Polpa Dentária (DPSCs). Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados (SHED). Células Estaminais do Ligamento Periodontal (PDLSCs). Células Estaminais da Papila Apical (SCAP). Células Estaminais do Folículo Dentário (DFPCs). Células Estaminais Mesenquimatosas da Gengiva (GMSCs). Células Estaminais Mesenquimatosas do Osso Alveolar (ABMSCs). Células Progenitoras do Gérmen Dentário (TGPCs).

Imagem gentilmente cedida por Elna Paul Chalisserry, Seung Yun Nam, Sang Hyug Park & Sukumaran Anil, 2017.

5.2.1. Células Estaminais da Polpa Dentária (CEPD)

A polpa dentária é um tecido mole de origem mesenquimatoso e ectomesenquimatoso, originado da papila dentária (Chalisserry et al., 2017). Desempenha diversas funções: auxílio no desenvolvimento dentário, nutrição, mineralização de dentina e recepção sensorial (Shuai et al., 2018).

As primeiras células estaminais mesenquimatosas dentárias foram isoladas da polpa dentária de terceiros molares. Exibiram taxas de proliferação elevadas e propriedades que lhes permitem formar colônias (Gronthos et al., 2000). Podem também ser isoladas de

dentes decíduos, supranumerários e em procedimentos de pulpectomia (Shuai et al., 2018).

In vitro têm potencial de diferenciação em odontoblastos, osteoblastos, endoteliócitos, células musculares, adipócitos, condrócitos, células neurais e melanócitos. *In vivo* apresentam capacidade de originar tecido dentário funcional sob a forma de complexos dentino-pulpaes. Têm também potencial de diferenciação odontogénico, miogénico, adipogénico e osteogénico, e capacidade de promover a angiogénese (Liu et al., 2015).

As CEPD apresentam ainda, capacidade de diferenciação em células estaminais multipotentes da crista neural. Estas, podem originar todas as linhagens celulares da crista neural embrionária (Liu et al., 2015).

Apesar de não ser conhecido um marcador celular específico para as CEPD sabe-se que expressam: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, STRO-1 e o fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (Oct-4) (Chalisserry et al., 2017). Por outro lado, os marcadores CD34, CD45 e CD71 não são expressos (Shuai et al., 2018).

Podem ser criopreservadas por um longo período de tempo sem que percam as propriedades de diferenciação e sem que deixem de expressar os marcadores moleculares que as caracterizam como uma população de CEPD (Shuai et al., 2018).

Atualmente, sabe-se que existem várias subpopulações de células progenitoras na polpa dentária. Estas, diferem entre si pela capacidade de autorrenovação, taxa de proliferação e potencial de diferenciação (Ulmer et al., 2010).

As CEPD do complexo dentino-pulpar são responsáveis pela formação de dentina terciária. Se ocorrer um tipo de dano leve à dentina em que não há destruição de odontoblastos, estes induzem a formação de dentina reacional. Por outro lado, quando o dano à dentina é severo e ocorre destruição de odontoblastos, as CEPD são mobilizadas e diferenciam-se em precursores odontoblásticos. A dentina formada através deste processo é a dentina reparadora. As CEPD estão também envolvidas no processo de deposição contínua de dentina, ao longo da vida (Sharpe, 2016).

5.2.2. Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados (CEDDE)

A transição da dentição decídua para a dentição permanente é um processo dinâmico e é controlado pela reabsorção radicular dos dentes decíduos. As CEDDE podem ser isoladas da polpa dentária coronária de dentes decíduos esfoliados (Liu et al., 2015).

Esta população é caracterizada por possuir elevada capacidade proliferativa, propriedades clonogénicas e potencial de diferenciação em diferentes linhagens: células neurais, adipócitos e odontoblastos (Miura et al., 2003).

In vitro apresentam capacidade de diferenciação nas linhagens odontogénica, osteogénica, adipogénica, condrogénica, miogénica, endotelial e angiogénica (Liu et al., 2015). *In vivo* podem originar odontoblastos, células endoteliais, células neurais, adipócitos e células osteoindutoras (Ulmer et al., 2010).

As CEDDE não apresentam capacidade de diferenciação em osteoblastos ou osteócitos. No entanto, podem induzir formação de tecido ósseo através do recrutamento de células osteogénicas. Possuem uma taxa de proliferação e diferenciação elevada, comparativamente às CEPD, o que as torna um grupo de células distinto e imaturo (Chalisserry et al., 2017).

As CEDDE podem ser caracterizadas pela expressão dos marcadores: das células estaminais mesenquimatosas CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 e CD166 (Bassir et al., 2016); das células estaminais embrionárias – Oct-4 e Nanog; e das células estaminais da crista neural – Nestina (Liu et al., 2015). Por outro lado não expressam CD14, CD34 e CD45 (Bassir et al., 2016).

Podem ser criopreservadas por um longo período de tempo sem que percam as propriedades de diferenciação e indução, e sem que deixem de expressar os marcadores de superfície que as caracterizam (Shuai et al., 2018).

5.2.3. Células Estaminais do Ligamento Periodontal (CELP)

As CELP são o tipo de célula estaminal mais frequentemente usadas para investigações que visam a regeneração de tecidos periodontais, sendo a primeira escolha entre as outras células estaminais com origem dentária (Shang et al., 2017).

Foram isoladas pela primeira vez em 2004, em terceiros molares. Apresentaram capacidade de diferenciação em células precursoras de cementoblastos, adipócitos e células formadores de colagénio, *in vitro*. No mesmo estudo, foram transplantadas para ratos onde originaram células precursoras de cimento e fibras de ligamento periodontal orientadas tridimensionalmente, à semelhança das fibras de Sharpey (Seo et al., 2004).

As CELP podem ser obtidas pelo esfregaço do terço médio da superfície radicular de dentes extraídos (Volponi & Sharpe, 2013). Podem ser criopreservadas sem que percam a capacidade de diferenciação, o potencial regenerativo e os marcadores moleculares que as caracterizam (Shuai et al., 2018). Apresentam uma elevada taxa de proliferação, comparativamente às CEPD (Chalisserry et al., 2017).

In vitro, as CELP possuem potencial de diferenciação osteogénico, condrogénico e adipogénico. *In vivo* podem originar células semelhantes às presentes em tecido ósseo, cimento radicular, cartilagem e ligamento periodontal (Liu et al., 2015).

As CELP podem ser caracterizadas pela expressão dos marcadores CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 e STRO-1. Por outro lado, não expressam os marcadores CD14, CD34, CD40, CD45, CD54, CD80 e CD86 (Bartold & Gronthos, 2017).

5.2.4. Células Estaminais da Papila Apical (CEPA)

A papila apical é um tecido mole, encontrado nos ápices dos dentes permanentes em desenvolvimento. Contribui para a formação dentária e posteriormente, origina a polpa dentária (Liu et al., 2015).

Foram isoladas pela primeira vez em 2006, em terceiros molares imaturos. *In vitro* mostraram capacidade de diferenciação em células precursoras de odontoblastos e adipócitos (Sonoyama et al., 2006).

As CEPA apresentam ainda, *in vitro*, capacidade de diferenciação osteoblástica. *In vivo* podem originar odontoblastos, osteoblastos, células precursoras de cementócitos e osteócitos (Liu et al., 2015). Quando isoladas de dentes sujeitos a ambiente inflamatório, mantêm o elevado potencial de proliferação e multipotência (Shuai et al., 2018).

As CEPA expressam elevados níveis dos marcadores CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146 e STRO-1. Não expressam os marcadores CD18, CD34 e CD150 (Bassir et al., 2016).

Apesar do elevado potencial na área da medicina regenerativa, serão necessários mais estudos clínicos e pré-clínicos para que se possa compreender os mecanismos de regulação e aplicação desta população de células estaminais (Shuai et al., 2018).

5.2.5. Células Estaminais do Folículo Dentário (CEFD)

O folículo dentário é um saco de tecido conjuntivo de origem mesenquimatosa que envolve o órgão de esmalte e a papila dentária do gérmen do dente em desenvolvimento. Controla a osteoclastogênese e a osteogênese durante a erupção dentária e posteriormente, origina os tecidos periodontais (Chalisserry et al., 2017).

Foram isoladas pela primeira vez em 2005, em terceiros molares, e caracterizadas como uma população de células estaminais mesenquimatosas que reside no periodonto antes ou durante a erupção dentária (Morscheck et al., 2005).

In vitro podem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos, cardiomiócitos, condrócitos, células neurais, hepatócitos, células das glândulas salivares e células ductais (J. Zhang et al., 2019).

Entre as outras células estaminais mesenquimatosas de origem dentária, as CEFD apresentam uma distinta capacidade de diferenciação osteogénica e propriedades imunomodulatórias. São excelentes candidatas para a regeneração de defeitos ósseos, regeneração de dentes, tratamento da doença periodontal e de doenças autoimunes (J. Zhang et al., 2019).

As CEFD expressam os marcadores: das células estaminais mesenquimatosas, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO-1; o marcador neural Nestina e o marcador pluripotente, Oct-4. Por outro lado, não expressam os marcadores hematopoiéticos CD14, CD31, CD34, CD45 e CD117 (J. Zhang et al., 2019).

As suas propriedades de multipotência são mantidas após criopreservação. Apesar do potencial na medicina regenerativa, são necessários mais estudos clínicos e pré-clínicos para um melhor conhecimento dos mecanismos inerentes ao seu controlo e aplicação (Shuai et al., 2018).

5.2.6. Células Estaminais Mesenquimatosas da Gengiva (CEMG)

Foram isoladas pela primeira vez em tecido gengival humano saudável e caracterizadas por apresentarem capacidade clonogénica, potencial de autorrenovação e de múltipla diferenciação (Q. Zhang et al., 2009).

As CEMG podem ser obtidas da cavidade oral, com mínimo desconforto para o paciente, através de biópsias ou durante procedimentos de exodontia (Du, Yang, & Ge, 2016). Outra vantagem permanece do facto de ocorrer rápida renovação e regeneração da arquitetura tecidual após a recolha. O tecido gengival representa a fonte mais abundante e acessível de células estaminais na cavidade oral (El-Sayed & Dörfer, 2016).

As CEMG podem também ser isoladas de tecido gengival hiperplásico causado por administração medicamentosa imunossupressiva, nomeadamente hiperplasia gengival provocada por ciclosporina A. Tang et al., (2011) demonstrou que esta população de CEMG apresenta maior propagação *in vitro* e maior taxa de formação de tecido após transplante *in vivo*.

In vitro podem originar osteoblastos, condrócitos e adipócitos. *In vivo* possuem potencial de diferenciação em células semelhantes a fibroblastos, fibras de colagénio e exibem potencial osteogénico. Apresentam também capacidade de autorrenovação (Liu et al., 2015).

As CEMG expressam os marcadores CD44, CD73, CD90, CD105 (Mitrano et al., 2010), CD166 e STRO-1 (Du et al., 2016). Por outro lado, não expressam CD34, CD45, CD54, CD38 (Mitrano et al., 2010) e CD14 (Du et al., 2016).

Possuem também propriedades imunomodulatórias. São não imunogénicas e permitem o transplante alogénico, sem que o recetor seja sujeito a uma resposta imunosupressora. Estas propriedades atuam de forma terapêutica no tecido recetor, melhorando a resposta inflamatória a que o paciente poderá estar sujeito após o transplante celular (El-Sayed & Dörfer, 2016).

5.2.7. Células Estaminais Mesenquimatosas do Osso Alveolar (CEMOA)

O osso alveolar é constituído por uma crista óssea espessa que contém os alvéolos dentários que suportam os dentes nas arcadas. Tem origem embriológica no folículo dentário (Liu et al., 2015). As células progenitoras responsáveis pela formação de osso alveolar encontram-se na região periosteal, no ligamento periodontal ou adjacentes a vasos sanguíneos (Chen, Sun, Lu, & Yu, 2012).

As CEMOA foram isoladas pela primeira vez em 2005, num estudo efetuado em 41 pacientes com idades compreendidas entre os 6 e os 66 anos. Demonstraram potencial proliferativo e osteogénico equivalente às células estaminais mesenquimatosas da medula óssea isoladas da crista ilíaca e níveis semelhantes de osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Ocorreu também diferenciação osteoblástica, confirmada pela expressão elevada de fosfatase alcalina (Matsubara et al., 2005).

In vitro têm potencial de diferenciação nas linhagens osteoblástica, condrogénica e adipogénica. *In vivo* podem induzir formação de tecido ósseo através da diferenciação em osteoblastos e osteócitos (Liu et al., 2015).

As CEMOA apresentam os típicos marcadores das células multipotentes mesenquimatosas CD73, CD90 e CD105. Por outro lado, não expressam CD45, CD34, CD14, CD79- α (Pekovits et al., 2013).

A técnica de recolha das CEMOA é minimamente invasiva e pouco dolorosa. Pode ser efetuada num laboratório ou durante uma intervenção cirúrgica a que o paciente seja sujeito (Pekovits et al., 2013).

As CEMOA recolhidas da linha oblíqua da mandíbula apresentam atividade osteogénica, adipogénica e condrogénica, semelhante à das células estaminais da medula óssea da crista ilíaca. Após mais investigações clínicas e pré-clínicas, poderão ser utilizadas como terapia celular para defeitos ósseos e periodontais (Pekovits et al., 2013).

5.2.8. Células Progenitoras do Gérmen Dentário (CPGD)

As CPGD foram isoladas pela primeira vez em gérmes de terceiros molares, na fase tardia de sino. Demonstraram elevada capacidade de proliferação e diferenciaram-se *in vitro* em osteoblastos, células neurais e hepatócitos (Ikeda et al., 2008).

As CPGD possuem capacidade de diferenciação *in vitro* em diversas linhagens: adipogénica, osteogénica, condrogénica, odontogénica, neurogénica, hepatogénica e endotelial. *In vivo* apresentam capacidade de formação de tecido ósseo (Liu et al., 2015).

À semelhança de outras populações de células estaminais mesenquimatosas, as CPGD apresentam expressão positiva dos marcadores CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166. Por outro lado, não expressam CD14, CD34, CD45 e CD133 (Liu et al., 2015).

6. Células Estaminais Mesenquimatosas Não Dentárias

As células estaminais multipotentes não dentárias também têm aplicação na regeneração de defeitos periodontais. Existem diversas fontes de células estaminais mesenquimatosas que residem em quase todos os órgãos: sangue do cordão umbilical, tecido adiposo, medula óssea, tecido muscular, fígado, pulmões, tendões, placenta e até de tecido cutâneo (Liu et al., 2015).

Neste capítulo, irei abordar duas populações de células estaminais adultas não dentárias que apresentam potencial periodontal regenerativo (Bassir et al., 2016).

6.1. Células Estaminais Mesenquimatosas da Medula Óssea (CEMMO)

As CEMMO são células estaminais multipotentes com potencial de diferenciação em diversas linhagens: fibroblástica, endotelial, osteogénica, condrogénica e adipogénica (Zhu, Liu, Li, & Jin, 2013). Podem ser isoladas de diversas partes do corpo: osso ilíaco, fémur, tibia e vértebras (Matsubara et al., 2005).

Apresentam um elevado potencial osteogénico através da diferenciação em osteoblastos e através do estímulo de um microambiente que promove a cicatrização óssea. Promovem também o recrutamento de células estaminais e osteoblastos dos tecidos adjacentes para o tecido a regenerar (Jensen et al., 2016).

À semelhança das outras células estaminais, as CEMMO expressam os marcadores moleculares das células estaminais mesenquimatosas CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO-1 e o marcador pluripotente, Oct-4. Por outro lado, não expressam os marcadores CD14, CD34 e CD45 (Zhu et al., 2013).

São as células estaminais mesenquimatosas mais amplamente estudadas na área da medicina regenerativa, devido ao fácil acesso a quantidades apropriadas para aplicação clínica (Chen et al., 2012). Apesar de apresentarem um bom potencial de diferenciação osteogénico a sua recolha é invasiva e apresenta desvantagens: morbilidade, baixo

número de células em cultura após colheita e perda do fenótipo durante a cultura (Jensen et al., 2016). Sabe-se também que, com o aumento da idade o número destas células no organismo diminui (Bassir et al., 2016).

6.2. Células Estaminais Derivadas de Tecido Adiposo (CEDTA)

O tecido adiposo é um tecido extraoral, através do qual podem ser obtidas células estaminais mesenquimatosas com potencial aplicação na regeneração dos tecidos periodontais (Han et al., 2014).

Apresentam propriedades de diferenciação semelhantes às CEMMO. A sua recolha pode ser efetuada com mínima ou ausência de dor para o paciente (Bassir et al., 2016). Podem ser obtidas em elevadas quantidades, em procedimentos como a lipoaspiração (Tobita, Uysal, Ogawa, Hyakusoku, & Mizuno, 2008).

As CEDTA apresentam potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos, miócitos, células neurais, células cardiovasculares, hepatócitos e adipócitos. Promovem também a secreção de fatores de crescimento envolvidos na angiogénese e na cicatrização fisiológica dos tecidos (Tobita & Mizuno, 2013).

Expressam um elevado número de marcadores, nomeadamente, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 e STRO-1. Por outro lado, não expressam os marcadores CD31, CD34 e CD45 (Bassir et al., 2016).

7. Transplante de Células Estaminais no Periodonto

O desenvolvimento de estratégias de colocação de células estaminais nos tecidos é tão importante quanto o potencial de diferenciação que apresentam. O transplante das células estaminais pode ser efetuado através da injeção direta das células ou recorrendo ao uso de biomateriais naturais ou sintéticos, que funcionam como matrizes. Esta escolha depende do tipo de tecido e patologia que se pretende tratar (Chen et al., 2012).

7.1. Injeção de Células Estaminais sem Biomateriais

Este procedimento pode ser efetuado através da injeção de uma suspensão de células a nível sistêmico ou diretamente no tecido a regenerar. Esta técnica é usada frequentemente na regeneração de tecido músculo-esquelético e no tratamento de doenças cardíacas. No entanto, a evidência científica demonstra que a sua aplicação na regeneração dos tecidos periodontais é ainda, elusiva (Chen et al., 2012).

7.1.1. Engenharia de Cell Sheets (CS)

A engenharia de CS é uma técnica desenvolvida em 2004 com o objetivo de contornar as limitações do uso de matrizes biodegradáveis e da injeção de células em suspensão (Yamato & Okano, 2004).

Este método conjugado com terapia celular é eficaz em procedimentos de regeneração periodontal. A grande limitação desta técnica é a delicada estrutura dos materiais e a consequente dificuldade na manipulação durante a cirurgia periodontal (Chen et al., 2012).

Esta técnica é baseada na junção de vários tipos de células em cultura. As células contêm polímeros sensíveis a estímulos térmicos. À temperatura de 37 graus celsius (°C) as células estão organizadas em CS. Quando a temperatura é inferior a 32°C as células separam-se de forma imediata sem que seja necessário o uso de enzimas proteolíticas. Desta forma, as junções celulares e a matriz extracelular não são danificadas (Moschouris, Firoozi, & Kang, 2016).

As células formam monocamadas intactas que podem ser transplantadas sem recurso a matrizes. O conceito de CS implica que as células assumam uma posição espacial que mimetiza por si só a matriz extracelular (Moschouris et al., 2016).

7.1.2. Agregados Celulares

Os agregados celulares são grupos de células com diâmetro entre 100 e 500 micrómetros. Quando colocados em cultura e sujeitos a condições de crescimento específicas, multiplicam-se de forma semelhante, estrutural e funcionalmente, ao tecido onde irão ser colocadas. Existe pouca evidência científica relativamente ao uso de agregados celulares na regeneração dos tecidos periodontais (Chen et al., 2012).

7.2. Injeção de Células Estaminais com Biomateriais

Os tecidos encontram-se organizados em estruturas tridimensionais. Na maioria dos casos, é necessário o uso de uma matriz que mimetize a matriz extracelular e que promova a correta distribuição espacial das células estaminais no tecido a regenerar (Chandki et al., 2012).

A matriz ideal deve preencher alguns requisitos: permitir um fluxo satisfatório de nutrientes, oxigénio e metabolitos; exibir biocompatibilidade e ausência de toxicidade; possuir força física e mecânica; estrutura porosa que permita a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular; ser permeável; possuir capacidade de vascularização *in vivo* e ser de fácil produção. É também necessário que a matriz seja gradualmente degradável (Chandki et al., 2012).

Na escolha da matriz a utilizar o clínico deve ter em consideração as suas propriedades físico-químicas, morfologia e cinética de degradação (Han et al., 2014).

O processo de degradação e reabsorção da matriz deve ocorrer à medida que o crescimento do tecido é efetuado. É, porém, importante reconhecer que cada um dos tecidos periodontais apresenta diferentes taxas de crescimento e maturação, o que dificulta a escolha da matriz. Está estabelecido que o tempo de degradação da matriz deve ser superior ao tempo de remodelação de todos os tecidos a regenerar (Han et al., 2014).

7.2.1. Polímeros

7.2.1.1. Polímeros Naturais

Os polímeros naturais são biocompatíveis e biodegradáveis. Permitem o controlo da porosidade, carga e força mecânica através de: alterações nas concentrações de polímeros ou nas condições de polimerização e introdução de grupos funcionais. A bioatividade destes polímeros também pode ser controlada através da adição de agentes químicos, proteínas, péptidos e células (Polo-Corrales et al., 2014).

As matrizes de polímeros naturais com aplicação na engenharia de tecidos são, entre outros, o colagénio, quitosano, seda, alginato, ácido hialurónico e péptidos. Estes materiais facilitam a adesão, migração, diferenciação e deposição celular (Polo-Corrales et al., 2014).

7.2.1.1.1. Péptidos de Hidrogel

Os péptidos de hidrogel têm elevado potencial na terapia com células estaminais. São constituídos por uma estrutura tridimensional de polímeros hidrofílicos com ligações cruzadas. Esta organização tridimensional ocorre de acordo com as condições mecânicas e fisiológicas do tecido. Apresentam capacidade de absorção de água e fluídos biológicos. A grande vantagem deste tipo de matrizes é o facto de poderem ser injetadas nos tecidos (Nagy et al., 2018).

A sua estrutura peptídica é semelhante à das proteínas da matriz extracelular dos tecidos periodontais. Desta forma, existe maior mimetização da matriz extracelular biológica (Nagy et al., 2018).

Recentemente, Nagy et al., (2018) procederam à injeção *in vitro* de Hydro Matrix (HydM), uma matriz peptídica de hidrogel desenvolvida para culturas celulares, com CELP. O objetivo do estudo foi verificar se esta estrutura seria indicada para promover a diferenciação osteogénica e proliferação das CELP. Após três semanas, a mineralização apresentava-se muito mais intensa no grupo de estudo comparativamente ao grupo de

controle. Os autores concluem que este tipo de matriz promove a adesão, migração, sobrevivência, proliferação e diferenciação osteogênica das CELP (Nagy et al., 2018).

7.2.1.2. Polímeros Sintéticos

Neste grupo, estão incluídos dois tipos de materiais: os poliésteres e os copolímeros. Os poliésteres são os materiais mais frequentemente usados na engenharia de tecidos. Existem 3 tipos: ácido poliglicólico, ácido polilático e policaprolactona. Os metabolitos de degradação destes materiais estão presentes no organismo humano e podem ser eliminados pelas vias metabólicas biológicas. Os copolímeros são materiais atrativos para a engenharia de tecidos por possuírem propriedades físico-químicas que podem ser facilmente manipuladas (Polo-Corrales et al., 2014).

7.2.2. Cerâmica

Os materiais de origem cerâmica com aplicação médica são designados por materiais biocerâmicos. Exibem biocompatibilidade, bioatividade e propriedades químicas semelhantes aos componentes do osso mineral. Os materiais biocerâmicos com aplicação na engenharia de tecidos são: biovidro, fosfato de cálcio, incluindo hidroxiapatite e beta fosfato tricálcico (β -FTC), e matriz de cerâmica derivada de corais (Polo-Corrales et al., 2014).

7.2.3. Metal

Os materiais metálicos utilizados na engenharia de tecidos são: aço inoxidável, ligas metálicas, como cromo-cobalto, e titânio. Estes biomateriais apresentam diversas desvantagens: liberação de íons metálicos tóxicos e partículas resultantes da sua corrosão, que podem causar lesões inflamatórias e reações alérgicas. Por esta razão, estes materiais não são biocompatíveis. Apresentam também, fraca estimulação do crescimento ósseo, dado que, possuem um módulo elástico pouco semelhante ao do tecido ósseo mineral (Polo-Corrales et al., 2014).

7.2.4. Compósito

Os compósitos foram desenvolvidos com o objetivo de obter várias funcionalidades de diferentes materiais, de forma sinérgica: reatividade de superfície, bioatividade, força mecânica e capacidade de distribuição de fatores de crescimento. Resultam da junção de diversos tipos de materiais e apresentam uma fase dispersa: polímero/cerâmica, cerâmica/metálico, polímero/metálico (Polo-Corrales et al., 2014).

8. Isolamento de Células Estaminais

É importante efetuar um adequado isolamento das células estaminais retiradas do tecido dador e impedir a sua contaminação. As tecnologias mais frequentemente usadas para este fim são: o sistema de separação magnético (SSM) e a citometria de fluxo (Du et al., 2016).

A citometria de fluxo surgiu com o objetivo de identificar e quantificar células. Através da dispersão de luz e propriedades fluorescentes, esta tecnologia identifica anomalias no tamanho e estrutura das células, e quantifica características funcionais com base na expressão de marcadores proteicos e testes citoquímicos. Este método identifica células específicas e tem capacidade de deteção de moléculas e organelos intracelulares (Galkowski et al., 2017).

A técnica SSM recorre à separação magnética de populações celulares distintas com base nos marcadores de superfície que apresentam. Uma esfera magnética é acoplada a diversos anticorpos monoclonais e colocada numa suspensão de células. As células atravessam uma coluna e forma-se um campo magnético, que as atrai. As restantes células podem ser recuperadas quando o campo magnético é desligado (Reinhardt, Bader, & Giri, 2014).

Outros tipos de tecnologias também usadas para o isolamento de células estaminais são: o sistema de separação por fluorescência (SSF), semelhante à tecnologia SS, com recurso a partículas fluorescentes; a tecnologia microfluídica que pode ser combinada ou integrada com outros métodos de separação celular e o sistema celution, um método de

isolamento que recorre à centrifugação para obter células estaminais de tecido adiposo (Reinhardt et al., 2014).

9. Reparação e Regeneração dos Tecidos Periodontais

Como referido anteriormente, o processo de cicatrização ou regeneração de um tecido requer a combinação de três componentes: sinalizadores moleculares, número apropriado de células progenitoras e matriz extracelular (Mitrano et al., 2010).

A terapia com células estaminais é vantajosa na medida em que, permite a reparação de tecidos sem que ocorra formação de tecido fibroso. Existe também uma probabilidade mínima de morbilidade e um baixo risco de rejeição autoimune (Mitrano et al., 2010).

As células estaminais atuam de duas formas distintas na regeneração dos tecidos periodontais: são uma fonte de células precursoras e estimulam o organismo a recrutar células endógenas responsáveis pelo desenvolvimento dos tecidos (Brozek, Kurpisz, & Koczorowski, 2018).

A nova estrutura periodontal deve ser constituída por fibras devidamente orientadas e inseridas no cimento e osso alveolar. O tecido recentemente formado, deve possuir capacidade de resistir às forças mastigatórias e promover a regeneração quando ocorrem danos à sua integridade (Jong et al., 2017). Para uma correta regeneração destas estruturas, é indispensável a presença de irrigação sanguínea (Brozek et al., 2018).

Até à data, existem diversos estudos que comprovam o potencial das células estaminais na regeneração periodontal. As CELP são as células de primeira escolha, apresentando um potencial pluripotente e capacidade de originar tecidos organizados tridimensionalmente (Shuai et al., 2018). As CEMMO também têm potencial na regeneração periodontal pela capacidade de potenciar a migração e diferenciação celular (H. Zhang et al., 2016). As CEPD e as CEDTA têm sido usadas em diversos estudos *in vivo*. As CEPI, as CEFD, as CEPA e as CEDDE representam também uma alternativa terapêutica, apesar de não estarem tão amplamente descritas na literatura. Ainda não

existe uma população celular considerada ideal para regeneração periodontal (Bassir et al., 2016).

9.1. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

Atualmente, existem apenas dois estudos que investigam o papel das células estaminais mesenquimatosas induzidas de CEPI, em defeitos periodontais (Hynes et al., 2013; H. Yang et al., 2014). O potencial das CEPI na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa permanece ainda, pouco claro (Botelho et al., 2017).

9.2. Células Estaminais da Polpa Dentária

As CEPD são candidatas à regeneração de defeitos ósseos, por possuírem um perfil de diferenciação semelhante ao das células ósseas (Chalisserry et al., 2017).

Num estudo efetuado em 2016, em modelo animal, foi comparado o potencial osteogénico das CEMMO e das CEPD. O objetivo foi regenerar defeitos ósseos cranianos em 14 porcos. As CEMMO foram extraídas da tíbia dos animais e as CEPD extraídas de terceiros molares. Usaram-se 3 tipos de matrizes: policaprolactona, ácido hialurónico e fosfato tricálcico. O ácido hialurónico foi usado para aumentar a área de superfície, facilitar a diferenciação osteogénica e estimular a migração celular. Observou-se uma elevada atividade de aloproteinase e maior deposição de cálcio nos grupos com CEPD comparativamente às CEMMO. As CEPD apresentaram maior potencial osteogénico que as CEMMO (Jensen et al., 2016).

Num estudo publicado por Aimetti, Ferrarotti, Gamba, Giraudi e Romano (2018) em 11 pacientes com idades compreendidas entre os 43 e 59 anos e diagnóstico de periodontite crónica generalizada, de acordo com a classificação em vigor à data da publicação do artigo, foram transplantadas CEPD autólogas para o tratamento de bolsas infra-ósseas profundas. As CEPD foram previamente isoladas e colocadas em matrizes de colagénio. Os critérios de inclusão para este estudo foram: índice de placa (IP) e gengival (IG) <15%; presença de defeito infra-ósseo profundo com profundidade de

sondagem (PS) $\geq 6\text{mm}$; nível ósseo radiográfico $\geq 3\text{mm}$ após tratamento periodontal não cirúrgico; presença de um dente com vitalidade pulpar e indicação para exodontia por impactação ou mau posicionamento na arcada. Nenhum dos pacientes era fumador ou apresentava qualquer patologia sistémica relacionada com a doença periodontal. Na avaliação clínica, 12 meses após o transplante, observou-se um aumento médio de $4.7 \pm 1.5\text{mm}$ do nível de inserção periodontal (NIP), diminuição de $5.0 \pm 1.3\text{mm}$ da PS, diminuição de $0.3 \pm 1.0\text{mm}$ da recessão gengival (RC) e $3.6 \pm 1.9\text{mm}$ de preenchimento ósseo radiográfico. Observou-se ainda que, 63.6% das bolsas periodontais apresentava PS $\leq 3\text{mm}$, sendo que, as restantes apresentavam PS $\leq 5\text{mm}$. Uma das limitações deste estudo, foi o facto de não existir grupo de controlo (Aimetti et al., 2018).

Ferrarotti et al., (2018) procederam ao transplante de CEPD de origem autóloga em defeitos periodontais. Os 29 pacientes com idades compreendidas entre os 29 e os 69 anos, foram diagnosticados com periodontite crónica severa, de acordo com a classificação das doenças periodontais em vigor à data do ensaio clínico. Os critérios de inclusão foram: IP e IG $< 15\%$; tratamento periodontal não cirúrgico há pelo menos 3 meses; defeito ósseo vertical com PS $\geq 6\text{mm}$; nível ósseo radiográfico $\geq 3\text{mm}$; presença de um dente com vitalidade pulpar e indicação para exodontia por posição anómala na arcada ou impactação. Nenhum dos pacientes incluídos no estudo possuía hábitos tabágicos ou qualquer patologia sistémica relacionada com a doença periodontal. As CEPD foram colocadas em matrizes de colagénio. Os pacientes foram avaliados clinicamente através dos parâmetros, IP, IG, PS, NIP e RG. No grupo de estudo observou-se, em média: uma melhoria de $4.9 \pm 1.4\text{mm}$ da PS e $4.5 \pm 1.9\text{mm}$ do NIP, 12 meses após o transplante. Observou-se ainda que 66.7% dos defeitos periodontais apresentaram PS $\leq 3\text{mm}$, comparativamente a 14.3% no grupo de controlo. Verificou-se também um aumento do NIP $\geq 4\text{mm}$ em 73.3% dos casos, comparativamente a 28.6% no grupo de controlo. Radiograficamente, a média de regeneração dos defeitos ósseos foi de $3.9 \pm 1.2\text{mm}$, comparativamente a $1.6 \pm 1.1\text{mm}$ no grupo de controlo (Ferrarotti et al., 2018).

Na interpretação dos resultados dos 2 artigos acima mencionados, há que ter em consideração o facto de ser necessário um dente vital como fonte dadora de células estaminais autólogas. Nestes estudos não foi possível comprovar que ocorreu regeneração dos tecidos, dado que não foi efetuada análise histológica (Ferrarotti et al., 2018).

Quando não é possível isolar CEPD de dentes com indicação para exodontia, estas podem ser recolhidas em procedimentos de pulpectomia. Num estudo piloto, foram colocadas CEPD autólogas de polpa dentária inflamada em defeitos periodontais infra-ósseos. O objetivo foi avaliar a viabilidade desta fonte dadora de células e o seu potencial na regeneração periodontal. As CEPD foram colocadas em matrizes de β -FTC. Os 2 pacientes incluídos no estudo tinham 30 e 38 anos de idade, apresentavam lesões endodôntico-periodontais e PS entre 5 e 6mm na zona do defeito ósseo. Não possuíam hábitos tabágicos nem qualquer patologia sistémica. Os pacientes foram avaliados clínica e radiograficamente 1, 3 e 9 meses após o transplante. Ocorreram melhorias nos parâmetros: RG, PS, grau da lesão de furca e mobilidade. Concluiu-se também que as CEPD de polpa inflamada apresentam capacidade osteogénica diminuída, face às isoladas de polpa vital (Y. Li et al., 2016).

Outra investigação que confirma a viabilidade de CEPD isoladas de polpa inflamada foi efetuada em modelo animal. Os autores procederam ao transplante de CEPD autólogas em defeitos periodontais criados cirurgicamente em 6 porcos. As CEPD foram colocadas em matriz de β -FTC. Após 12 semanas foram avaliados os parâmetros clínicos: IP, IG, PS, NIP e nível ósseo radiográfico. Todos os parâmetros analisados nos grupos de estudo apresentaram resultados superiores face ao grupo de controlo. No entanto, os resultados obtidos com as células de polpa inflamada foram menos satisfatórios que os obtidos com as células isoladas de polpa vital (Y. Li, Nan, Zhong, Li, & Li, 2019).

Nem sempre é possível efetuar a recolha de células estaminais autólogas. Na maioria dos casos, é necessário recorrer a fontes alogénicas. O efeito secundário mais previsível é a inflamação crónica dos tecidos com aumento da taxa de morte celular (Venkataiah et al., 2019).

Hernández-Monjaraz, Santiago-Osorio, Ledesma-Martínez, Alcauter-Zavala, e Mendoza-Núñez (2018) relatam o caso clínico de um paciente com 61 anos, onde é efetuado o transplante de CEPD de origem alogénica. O 2º pré-molar inferior esquerdo apresentava cálculo supra e infra-gengival, hemorragia à sondagem, mobilidade dentária grau II e PS de 6.5mm. Radiograficamente, observou-se uma zona radiotransparente ao nível do defeito ósseo. Foi efetuado tratamento periodontal não cirúrgico, substituição de restaurações prévias, ajuste oclusal e educação para uma correta higiene oral, previamente

à cirurgia. As CEPD foram isoladas de um dador com 7 anos de idade e colocadas em matriz de colagénio. Na avaliação efetuada 6 meses após a cirurgia, o paciente não apresentava qualquer sinal ou sintoma de rejeição. Observou-se clinicamente: PS de 3.5mm, mobilidade dentária grau I e formação óssea através de tomografia computadorizada de feixe cónico (CBCT) e densitometria óssea. Este é o primeiro estudo que relata o transplante de CEPD alogénicas em humanos. No entanto, apresenta como limitação a baixa evidência científica (Hernández-Monjaraz et al., 2018).

9.3. Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados

Ma et al., (2012) conclui que as CEDDE têm capacidade de regenerar defeitos ósseos em ratos. Noutro estudo em modelo animal publicado em 2013, os autores comparam 2 populações de CELP, isoladas de dentes decíduos esfoliados e isoladas de dentes permanentes. *In vitro* as CELP de dentes decíduos esfoliados apresentaram maior taxa de proliferação, diferenciação e capacidade de formação de colónias, comparativamente às de dentes permanentes. Quando transplantadas para ratos, as CELP de dentes decíduos esfoliados apresentaram capacidade de formação de tecidos semelhantes a cimento e ligamento periodontal (Ji et al., 2013).

Outro estudo em modelo animal publicado em 2014, corrobora os resultados acima descritos. O objetivo desta investigação foi comparar o potencial das CEDDE e CELP na regeneração de defeitos periodontais. As células foram colocadas em matrizes de hidroxiapatite e fosfato tricálcico, e transplantadas em porcos. Ambos os grupos mostraram resultados satisfatórios na regeneração de cimento, osso alveolar e ligamento periodontal (Fu, Jin, Ma, Fan, & Wang, 2014).

Apesar dos efeitos promissores na regeneração de tecido ósseo, a evidência científica que suporta o uso das CEDDE na regeneração dos tecidos periodontais é, até à data, elusiva (Bassir et al., 2016).

9.4. Células Estaminais do Ligamento Periodontal

Existem diversos estudos que comprovam a eficácia das CELP na regeneração de defeitos periodontais em modelo animal (Bassir et al., 2016). Um estudo publicado por Tsumanuma et al., (2011) compara a eficácia das CELP, CEMMO e CEMOA autólogas. As células foram colocadas em matrizes de β -FTC e colagénio. Foram criados defeitos ósseos de uma parede em 4 cães. Após 8 semanas, observou-se regeneração de osso alveolar em todos os grupos sem diferenças estatisticamente significantes. O grupo sujeito a transplante com CELP apresentou, maior percentagem de formação de cemento celular e acelular, maior espessura de cemento e ligamento periodontal e fibras de colagénio inseridas perpendicularmente ao cemento. Nos grupos de CEMMO e CEMOA, as fibras do ligamento periodontal estavam orientadas oblíqua e paralelamente em relação ao cemento. Os autores concluem que as 3 populações apresentam capacidade de regeneração de defeitos periodontais. No entanto, as CELP apresentaram os resultados mais favoráveis (Tsumanuma et al., 2011).

Está também descrito que a aplicação de CELP autólogas em associação com RTG, promove de forma significativa, a regeneração de defeitos periodontais. Foram criados defeitos de furca grau III em modelo canino. As CELP foram colocadas em matrizes de colagénio. Após 12 semanas observou-se que o grupo de estudo mostrava resultados superiores na regeneração de cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, comparativamente aos grupos de controlo (Suaid et al., 2012).

Existem poucos ensaios clínicos que relatam a aplicação de CELP na regeneração de defeitos periodontais. Num estudo piloto retrospectivo, é avaliada a viabilidade do transplante de CELP autólogas. Foram incluídos 3 indivíduos com idades compreendidas entre os 25 e 42 anos, diagnosticados com periodontite crónica generalizada, de acordo com a classificação das doenças periodontais em vigor à data do estudo. No total, foram avaliados 16 dentes com diagnóstico pulpar vital e sem patologia perirradicular. Os pacientes foram previamente sujeitos a tratamento periodontal não cirúrgico. Na avaliação pré-cirúrgica, os dentes apresentavam pelo menos, um defeito infra-ósseo profundo com PS \geq 6mm. As CELP foram recolhidas de terceiros molares dos pacientes, e colocadas em matrizes de hidroxiapatite e β -FTC. Durante 72 meses, foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: PS, margem gengival (MG), NIP, mobilidade dentária

e RG. Em todos ocorreram melhorias significativas. Na avaliação radiográfica aos 72 meses observou-se regeneração dos tecidos (Feng et al., 2010).

Num ensaio clínico publicado em 2018, foram usadas CELP autólogas em 10 pacientes, com idades compreendidas entre os 33 e 63 anos, com diagnóstico de periodontite crónica, de acordo com a classificação das doenças periodontais em vigor à data do estudo. As CELP foram colocadas em CS com grânulos de β -FTC. Todos os pacientes foram sujeitos a tratamento periodontal não cirúrgico prévio. As localizações com indicação para regeneração apresentavam PS ≥ 4 mm. As CELP foram isoladas de terceiros molares. Na avaliação clínica e radiográfica efetuada 6 meses após o procedimento cirúrgico, avaliou-se em média: aumento de 3.2 ± 1.9 mm da PS, aumento de 2.5 ± 2.6 mm do NIP e aumento de 2.3 ± 1.8 mm da crista óssea alveolar. Este estudo apresenta como limitação o número reduzido de pacientes (Iwata et al., 2018).

Apesar das CELP autólogas apresentarem bons resultados, nem sempre é possível a sua obtenção. Outra limitação é a sua viabilidade, que é dependente da idade e estado de saúde do paciente. Em alternativa, pode recorrer-se a uma fonte alogénica (Bassir et al., 2016).

Num estudo publicado em 2010, efetuado em modelo animal, os autores concluem que as CELP de origem alogénica possuem capacidade regenerativa semelhante às de origem autóloga. Ambas as populações celulares foram colocadas em matrizes de hidroxiapatite e fosfato tricálcico. Na amostra foram incluídos 30 defeitos periodontais de 15 porcos. Após 12 semanas, observou-se: diminuição significativa da PS e aumento no nível da crista óssea alveolar em ambos os grupos de estudo. A análise histológica confirmou a formação de osso alveolar, cemento e ligamento periodontal em ambos os grupos (Ding et al., 2010).

Outro estudo, efetuado em modelo animal, corrobora os resultados acima apresentados. Foram usadas CELP alogénicas em defeitos periodontais criados cirurgicamente. As células foram colocadas em matrizes Gelfoam®. Esta matriz é biocompatível, biodegradável e possui elevada afinidade com as proteínas da matriz extracelular fisiológica. A amostra foi constituída por 13 ovelhas. A análise histológica feita 4 semanas após o procedimento cirúrgico demonstra: osso alveolar, cemento e

ligamento periodontal, recentemente formados, e fibras do ligamento periodontal orientadas perpendicularmente e inseridas no cimento (Mrozik et al., 2013).

Com o objetivo de perceber se a interação de CELP e CEMOA alogénicas melhoraria a capacidade de regeneração periodontal, estas células foram colocadas em defeitos periodontais de 18 ratos. Ambas as populações de origem humana foram colocadas em CS. Observou-se maior regeneração e secreção de colagénio no grupo de estudo, face ao grupo de controlo. Este estudo sugere que a junção de diferentes populações celulares promove a capacidade osteogénica e aumenta a secreção de matriz extracelular (H. Zhang et al., 2016).

Como alternativa às CELP de origem alogénica, as células estaminais mesenquimatosas do cordão umbilical humano (CEMCUH) podem ser uma opção terapêutica em procedimentos regenerativos. Estas células obtidas de doadores recém-nascidos apresentam baixa taxa de reações imunológicas (Shang et al., 2017).

Num estudo publicado em 2017, o potencial das CELP e das CEMCUH é comparado. Foram criados defeitos periodontais em ratos. Estes foram sujeitos a condições inflamatórias. Os resultados demonstraram que, as CELP apresentam maior potencial osteogénico e que, as CEMCUH apresentam maior taxa de secreção de matriz extracelular e capacidades anti-inflamatórias superiores. No entanto, ambas as populações apresentaram regeneração dos defeitos periodontais, sem diferenças estatisticamente significantes. As CEMCUH podem, após mais estudos clínicos e pré-clínicos, ser usadas em procedimentos regenerativos, em pacientes de idade avançada ou que não necessitem de efetuar extrações (Shang et al., 2017).

9.5. Células Estaminais da Papila Apical

Atualmente, não existe evidência científica suficiente que corrobore a aplicação de CEPA para regeneração de tecidos periodontais (Bassir et al., 2016). O potencial destas células é suportado por um estudo publicado em 2018. Os autores procederam ao transplante de CEPA em defeitos periodontais de porcos. Após 12 semanas, os resultados demonstraram que ocorreu regeneração periodontal (G. Li et al., 2018).

9.6. Células Estaminais do Folículo Dentário

As CEFD também apresentam potencial para regeneração de tecidos periodontais. Num estudo efetuado em modelo animal, os autores transplantaram CEFD e CELP autólogas em defeitos periodontais criados cirurgicamente em cães. O objetivo foi comparar o potencial destas duas populações de células. A análise histológica demonstrou regeneração de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, em ambos os grupos. No entanto, o volume de tecido ósseo regenerado foi inferior nos defeitos tratados com CEFD (Park, Jeon, & Choung, 2011).

Outro estudo publicado em 2011 refere que as CEFD em CS têm capacidade de regeneração de tecidos periodontais em ratos. Conclui-se também que as CEFD na presença de células da BEH demonstram comportamento cementogénico e osteogénico, e expressam um maior número de marcadores relacionados com cementoblastos e osteoblastos, a nível génico e proteico. A cultura de CEFD com células da BEH poderá constituir uma terapêutica opcional para futura aplicação na regeneração dos tecidos periodontais (Bai et al., 2011).

O potencial das CEFD é reforçado num estudo de 2011. Os autores obtiveram CEFD de terceiros molares inclusos e transplantaram-nas para ratos. Observou-se formação de uma estrutura semelhante a cimento radicular e ligamento periodontal (W. Guo et al., 2011). Noutro artigo publicado em 2013, os autores usaram a mesma fonte dadora de células que o estudo acima referido e colocaram-nas em CS, transplantando-as para ratos. Os resultados demonstraram formação de tecido periodontal (S. Guo et al., 2013).

A evidência científica demonstra que as CEFD são uma terapia opcional em procedimentos que visam a regeneração de tecidos periodontais. No entanto, a sua eficácia ainda não se mostrou equivalente à terapia com outras populações de células estaminais. Serão necessárias mais investigações clínicas e pré-clínicas, para melhor compreensão dos mecanismos inerentes ao seu controlo e aplicação (Bassir et al., 2016).

9.7. Células Estaminais Mesenquimatosas da Medula Óssea

O potencial de regeneração das CEMMO em tecidos periodontais está amplamente descrito na literatura. Esta população apresenta no entanto, diversas desvantagens: decréscimo no número de células disponíveis no organismo para colheita, à medida que a idade avança, e redução do potencial proliferativo, quando colocadas em cultura (Bassir et al., 2016).

Um estudo publicado em 2012, relata que não existem diferenças, relativas à formação de cemento e osso alveolar, entre a aplicação de osso cortical autógeno (OCA) e CEMMO, em modelo animal. As CEMMO foram isoladas da crista ilíaca e colocadas em matriz de plasma rico em plaquetas (PRP). O OCA e as CEMMO foram transplantados para tratamento de defeitos de furca grau II em cães (Simsek, Keles, Baris, & Cetinkaya, 2012). O PRP é amplamente utilizado na área da medicina regenerativa. Possui elevadas concentrações de fatores de crescimento e proteínas secretoras, que potenciam a migração, proliferação e diferenciação das células envolvidas na regeneração dos tecidos (Tobita, Uysal, Guo, Hyakusoku, & Mizuno, 2013).

Em alternativa às limitações do uso de CEMMO de origem autóloga, foram efetuados diversos estudos com o objetivo de perceber se o uso das CEMMO alogénicas seria uma alternativa de tratamento viável (Bassir et al., 2016).

Em 2010, foi publicado um artigo que relata a aplicação de CEMMO de origem alogénica no tratamento de defeitos periodontais, em modelo animal. As CEMMO foram transplantadas em ratos e marcadas com proteína fluorescente verde (PFV). Os resultados obtidos 3 semanas após o transplante demonstram formação de tecido ósseo, cemento e ligamento periodontal. As fibras do ligamento periodontal, no grupo de estudo, encontravam-se devidamente orientadas e inseridas perpendicularmente ao cemento radicular. Constatou-se ainda que as CEMMO estavam integradas no tecido recentemente formado, através da análise da PFV, provando a sua contribuição na regeneração dos tecidos periodontais (Y. Yang, Rossi, & Putnins, 2010).

Outro grupo de investigadores em 2011, procedeu à administração intravenosa de CEMMO alogénicas em ratos, marcadas com PFV. O objetivo do estudo foi concluir se as CEMMO apresentavam capacidade de diferenciação em células progenitoras de tecidos periodontais. A hipótese em estudo foi comprovada. As CEMMO contribuem para a regeneração dos tecidos periodontais e podem diferenciar-se em células que originam tecidos específicos, incluindo fibroblastos e osteoblastos (Zhou et al., 2011).

Até à data, são escassas as investigações clínicas que descrevem a aplicação de CEMMO em procedimentos de regeneração periodontal. Um estudo publicado em 2013 relata o transplante de CEMMO autólogas na regeneração de tecido ósseo e periodontal. Foram incluídos 104 indivíduos com idades compreendidas entre os 19 e os 78 anos, dos quais, 36 foram sujeitos a regeneração óssea guiada, 39 elevação do seio maxilar, 12 preservação do alvéolo após exodontia e 17 regeneração periodontal. As células foram isoladas da crista ilíaca e colocadas em matrizes de PRP. Nos pacientes sujeitos a regeneração periodontal, os resultados clínicos demonstram que ocorreu em média: 5.12 ± 2.45 mm de redução da PS, 4.29 ± 1.32 mm de aumento do NIP e 3.12 ± 1.23 mm de aumento do nível ósseo radiográfico. Apesar dos resultados observados, a maior limitação deste estudo é o facto de não existir grupo de controlo (Yamada et al., 2013).

Outro estudo publicado em 2016, refere o transplante de CEMMO autólogas em 10 pacientes com idades compreendidas entre 35 e 60 anos de idade. Os pacientes apresentavam defeitos infra-ósseos de uma, duas e três paredes com PS ≥ 4 mm após tratamento periodontal não cirúrgico. Como grupo de controlo, foram usados 2 dentes em cada paciente. As CEMMO foram recolhidas da crista ilíaca e colocadas em matrizes de ácido poli-L-lático biodegradável e PRP. Durante um período de 36 meses foram observadas, em média, melhorias nos seguintes parâmetros clínicos: 3.24 mm de aumento do NIP, 3.16 mm de aumento da PS e 4.8 mm de aumento do nível ósseo radiográfico. Os pacientes foram também sujeitos a exames médicos sucessivos, análises sanguíneas e de urina. Não foram observadas complicações sistémicas (Baba et al., 2016).

Apesar da evidência científica apresentada, serão necessários mais ensaios clínicos para avaliar o potencial de aplicação de CEMMO no tratamento de defeitos periodontais (Bassir et al., 2016).

9.8. Células Estaminais Derivadas de Tecido Adiposo

As CEDTA também são potenciais candidatas à regeneração de tecidos periodontais. Apresentam capacidade de modulação do sistema imune e da resposta inflamatória *in vitro* e *in vivo*, através da secreção de citocinas e interações celulares (Lemaitre et al., 2016).

Um artigo publicado em 2008, relata a aplicação CEDTA na regeneração de tecidos em defeitos periodontais de ratos. As células foram colocadas em matriz de PRP e marcadas com PFV. Após 8 semanas, os resultados demonstraram que ocorreu formação de osso alveolar, cemento e fibras semelhantes ao ligamento periodontal orientadas perpendicularmente ao cemento. No grupo que recebeu apenas PRP, apesar de ter ocorrido formação de osso alveolar, não ocorreu formação de cemento e ligamento periodontal. A análise aos osteócitos presentes no osso alveolar e células do ligamento periodontal recentemente formados, indica presença de PFV, o que demonstra a contribuição das CEDTA na regeneração dos tecidos (Tobita et al., 2008).

Outro estudo publicado em 2013, descreve a aplicação de CEDTA autólogas na regeneração de defeitos de furca grau III em modelo canino. As células foram colocadas em matriz de PRP. A análise histológica demonstra que ocorreu formação de ligamento periodontal, inserido perpendicularmente ao cemento no grupo de estudo (Tobita et al., 2013).

Os resultados acima apresentados são corroborados por outra investigação publicada em 2014. Os autores transplantaram CEDTA em matrizes de Poli(Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) para tratamento de fenestrações. As análises histomorfométricas feitas aos ratos revelam que ocorreu formação de cemento, osso alveolar e ligamento periodontal em percentagens significativamente elevadas, comparativamente aos grupos de controlo. O ligamento periodontal e o cemento recentemente formados, apresentavam uma espessura maior no grupo de estudo, comparativamente aos grupos de controlo (Akita et al., 2014).

Em 2016, foi publicada uma investigação que descreve a aplicação de CEDTA no tratamento de doença periodontal induzida por bactérias, em ratos. As células foram

colocadas em matriz de colagénio. Após 12 semanas, constatou-se que o grupo de estudo apresentava maior percentagem de formação de cimento radicular e ligamento periodontal. As fibras do ligamento periodontal encontravam-se devidamente orientadas, espessas e densas, comparativamente aos grupos de controlo. Ocorreu também uma maior percentagem de vascularização da área regenerada, relativamente aos grupos de controlo. Este estudo sugere que o transplante de CEDTA, num periodonto com doença periodontal estabelecida, induz a melhoria da inflamação e manutenção da homeostase nos tecidos (Lemaitre et al., 2016).

Recentemente, numa investigação publicada em 2019 o potencial regenerativo e anti-inflamatório das CEDTA no tratamento da doença periodontal é também comprovado. Os autores procederam ao transplante de CEDTA autólogas e alogénicas em defeitos periodontais de porcos. Ambos os grupos de estudo obtiveram maior percentagem de regeneração de osso alveolar, cimento e ligamento periodontal, com as fibras devidamente orientadas, assim como uma significativa diminuição da inflamação dos tecidos, comparativamente aos grupos de controlo. No entanto, de um modo geral, o grupo das CEDTA alogénicas exibiu melhores resultados e maior percentagem de regeneração periodontal comparativamente ao grupo das CEDTA autógenas (Venkataiah et al., 2019).

Apesar da evidência científica apresentada, serão necessárias mais investigações clínicas e pré-clínicas para compreender os mecanismos das CEDTA, assim como as suas funções imunomoduladoras (Venkataiah et al., 2019).

III. Conclusão

A doença periodontal é uma patologia com elevada prevalência que afeta uma grande percentagem da população mundial. Atualmente, as abordagens no tratamento desta patologia estão focadas na recuperação dos tecidos lesados, ao invés da simples cessação da progressão da doença periodontal.

Nos últimos anos, o interesse científico na área da investigação da medicina regenerativa tem aumentado. A regeneração periodontal é um processo que visa o restabelecimento da anatomia e função do cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar.

Até à data, foram identificadas diversas populações de células estaminais com elevado potencial na regeneração de tecidos periodontais, nomeadamente, as CEPI, CEPD, CEDDE, CELP, CEPA, CEMMO, CEFD e CEDTA. As células estaminais dentárias são de extrema importância, não apenas em Medicina Dentária, na regeneração e preservação de estruturas dentárias, como noutras áreas da Medicina, visto que permanecem durante toda a vida e apresentam uma capacidade incrível de multipotência.

Apesar dos resultados favoráveis na regeneração periodontal das diversas investigações apresentadas nesta revisão de literatura, a aplicação de células estaminais ainda não é uma realidade na prática clínica. Não existem protocolos estabelecidos relativamente ao tipo de célula, dose ótima e modo de administração a usar na regeneração periodontal. É imperativo que sejam efetuados mais estudos clínicos e pré-clínicos nesta área, por forma a determinar quais os mecanismos de controlo no microambiente patológico característico da doença periodontal e como proceder à otimização dos protocolos de criopreservação das células estaminais.

É necessário ultrapassar também alguns desafios, como as diferenças associadas às culturas celulares das distintas populações de células estaminais e a variabilidade da eficácia da terapia em diferentes pacientes. Apenas desta forma, conseguiremos ampliar

e potencializar as células estaminais como possível terapia celular em pacientes com poucas ou nenhuma alternativa terapêutica.

IV. Bibliografia

- Aimetti, M., Ferrarotti, F., Gamba, M. N., Giraudi, M., & Romano, F. (2018). Regenerative Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Autologous Dental Pulp Stem Cells: A 1-Year Follow-Up Case Series. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 38(1), 51–58. <https://doi.org/10.11607/prd.3425>
- Akita, D., Morokuma, M., Saito, Y., Yamanaka, K., Akiyama, Y., Sato, M., ... Honda, M. J. (2014). Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds. *BioMed Research*, 35(2), 91–103.
- Baba, S., Yamada, Y., Komuro, A., Yotsui, Y., Umeda, M., Shimuzutani, K., & Nakamura, S. (2016). Phase I/II Trial of Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation with a Three-Dimensional Woven-Fabric Scaffold for Periodontitis. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6205910>
- Bai, Y., Bai, Y., Matsuzaka, K., Hashimoto, S., Fukuyama, T., Wu, L., ... Inoue, T. (2011). Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. *Bone*, 48(6), 1417–1426. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.02.016>
- Balic, A. (2018). Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(4), 382–388. <https://doi.org/10.1159/000486592>
- Balic, A., & Thesleff, I. (2015). Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. In Y. Chai (Ed.), *Craniofacial Development* (1st ed., Vol. 115, pp. 157–186). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.006>
- Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2017). Standardization of Criteria Defining Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 96(5), 487–490. <https://doi.org/10.1177/0022034517697653>

- Bassir, S. H., Wisitrasameewong, W., Raanan, IJ., Ghaffarigarakani, S., Chung, J., Freire, M., ... Intini, G. (2016). Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 50–61. <https://doi.org/10.1002/jcp.25067>
- Botelho, J., Cavacas, M. A., Machado, V., & Mendes, J. J. (2017). Dental Stem Cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine*, 49(8), 644–651. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1347705>
- Brozek, R., Kurpisz, M., & Koczorowski, R. (2018). Application of stem cells in dentistry for bone regeneration. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1), 23–33. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.1.03>
- Chalisserry, E. P., Nam, S. Y., Park, S. H., & Anil, S. (2017). Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal of Tissue Engineering*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1177/2041731417702531>
- Chandki, R., Kala, M., Banthia, P., & Banthia, R. (2012). From Stem to Roots: Tissue engineering in Endodontics. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 4(1), 66–71. <https://doi.org/10.4317/jced.50678>
- Chen, F.-M., Sun, H.-H., Lu, H., & Yu, Q. (2012). Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33(27), 6320–6344. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.048>
- Dabija-Wolter, G., Bakken, V., Cimpan, M. R., Johannessen, A. C., & Costea, D. E. (2013). In vitro reconstruction of human junctional and sulcular epithelium. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(5), 396–404. <https://doi.org/10.1111/jop.12005>
- Dean, R. (2017). The Periodontal Ligament: Development, Anatomy and Function. *Oral Health and Dental Management*, 16(6), 1–7.
- Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J., & Hefti, A. F. (2013). Principles of periodontology. *Periodontology* 2000, 61(1), 16–53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00397.x>

- Ding, G., Liu, Y., Wang, W., Wei, F., Liu, D., Fan, Z., ... Wang, S. (2010). Allogeneic Periodontal Ligament Stem Cell Therapy for Periodontitis in Swine. *Stem Cells*, 28(10), 1829–1838. <https://doi.org/10.1002/stem.512>
- Du, L., Yang, P., & Ge, S. (2016). Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. *Journal of Dental Sciences*, 11(3), 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.010>
- El-Sayed, K. M. F., & Dörfer, C. E. (2016). Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/7154327>
- Feng, F., Akiyama, K., Liu, Y., Yamaza, T., Wang, T.-M., Chen, J.-H., ... Shi, S. (2010). Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: A report of 3 cases. *Oral Diseases*, 16(1), 20–28. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01593.x>
- Ferrarotti, F., Romano, F., Gamba, M. N., Quirico, A., Giraudi, M., Audagna, M., & Aimetti, M. (2018). Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(7), 841–850. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12931>
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embriology and Experimental Morphology*, 16(3), 381–390.
- Fu, X., Jin, L., Ma, P., Fan, Z., & Wang, S. (2014). Allogeneic Stem Cells From Deciduous Teeth Mediated Treatment for Periodontitis in Miniature Swine. *Journal of Periodontology*, 85(6), 845–851. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130254>
- Galkowski, D., Ratajczak, M. Z., Kocki, J., & Darzynkiewicz, Z. (2017). Of Cytometry, Stem Cells and Fountain of Youth. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(4), 465–481. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9733-5>

- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Guo, S., Guo, W., Yi, D., Gong, J., Zou, Q., Xie, D., ... Tian, W. (2013). Comparative study of human dental follicle cell sheets and periodontal ligament cell sheets for periodontal tissue regeneration. *Cell Transplantation*, 22(6), 1061–1073. <https://doi.org/10.3727/096368912X656036>
- Guo, W., Chen, L., Gong, K., Ding, B., Duan, Y., & Jin, Y. (2011). Heterogeneous Dental Follicle Cells and the Regeneration of Complex Periodontal Tissues. *Tissue Engineering: Part A*, 18(5–6), 459–470. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0261>
- Han, J., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 59(1), 117–130. <https://doi.org/10.1111/adj.12100>
- Hernández-Monjaraz, B., Santiago-Osorio, E., Ledesma-Martínez, E., Alcauter-Zavala, A., & Mendoza-Núñez, V. M. (2018). Retrieval of a periodontally compromised tooth by allogeneic grafting of mesenchymal stem cells from dental pulp: A case report. *Journal of International Medical Research*, 46(7), 2983–2993. <https://doi.org/10.1177/0300060518773244>
- Hynes, K., Menicanin, D., Han, J., Marino, V., Mrozik, K., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2013). Mesenchymal Stem Cells from iPS Cells Facilitate Periodontal Regeneration. *Journal of Dental Research*, 92(833–839), 1–7. <https://doi.org/10.1177/0022034513498258>
- Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., ... Ohgushi, H. (2008). Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76(5), 495–505. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x>

- Iwata, T., Yamato, M., Ishikawa, I., Ando, T., & Okano, T. (2014). Tissue Engineering in Periodontal Tissue. *The Anatomical Record*, 297(1), 16–25. <https://doi.org/10.1002/ar.22812>
- Iwata, T., Yamato, M., Washio, K., Yoshida, T., Tsumanuma, Y., Yamada, A., ... Ishikawa, I. (2018). Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets - A safety and efficacy study in ten patients. *Regenerative Therapy*, 9, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.07.002>
- Jensen, J., Tvedesøe, C., Rölffing, J. H. D., Foldager, C. B., Lysdahl, H., Kraft, D. C. E., ... Bünger, C. E. (2016). Dental pulp-derived stromal cells exhibit a higher osteogenic potency than bone marrow-derived stromal cells in vitro and in a porcine critical-size bone defect model. *SICOT-J*, 2, 16. <https://doi.org/10.1051/sicotj/2016004>
- Ji, K., Liu, Y., Lu, W., Yang, F., Yu, J., Wang, X., ... Xuan, K. (2013). Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *Journal of Periodontal Research*, 48(1), 105–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01509.x>
- Jong, T. de, Bakker, A. D., Everts, V., & Smit, T. H. (2017). The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *Periodontal Research*, 52(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jre.12477>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- Lemaitre, M., Monsarrat, P., Blasco-Baque, V., Loubières, P., Burcelin, R., Casteilla, L., ... Kémoun, P. (2016). Periodontal Tissue Regeneration Using Syngeneic Adipose-Derived Stromal Cells in a Mouse Model. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(2), 656–665. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0028>
- Li, G., Han, N., Zhang, X., Yang, H., Cao, Y., Wang, S., & Fan, Z. (2018). Local Injection of Allogeneic Stem Cells from Apical Papilla Enhanced Periodontal Tissue Regeneration in Minipig Model of Periodontitis. *BioMed Research International*,

2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3960798>
- Li, Y., Nan, X., Zhong, T.-Y., Li, T., & Li, A. (2019). Treatment of Periodontal Bone Defects with Stem Cells from Inflammatory Dental Pulp Tissues in Miniature Swine. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(2), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-00175-7>
- Li, Y., Zhao, S., Nan, X., Wei, H., Shi, J., Li, A., & Gou, J. (2016). Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0404-2>
- Liu, J., Yu, F., Sun, Y., Jiang, B., Zhang, W., Yang, J., ... Liu, S. (2015). Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 33(3), 627–638. <https://doi.org/10.1002/stem.1909>
- Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G., ... Yamaza, T. (2012). Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS ONE*, 7(12), 51777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051777>
- Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., ... Kato, Y. (2005). Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(3), 399–409. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041117>
- Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrión, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., ... Sanz, A. (2010). Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. *Journal of Periodontology*, 81(6), 917–925. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090566>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(10), 5807–5812.

- https://doi.org/10.1073_pnas.0937635100
- Morszeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., ... Hoffmann, K. H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 24(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.12.004>
- Moschouris, K., Firoozi, N., & Kang, Y. (2016). The application of cell sheet engineering in the vascularization of tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, 11(6), 559–570. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0059>
- Mrozik, K. M., Wada, N., Marino, V., Richter, W., Shi, S., Wheeler, D. L., ... P. M., B. (2013). Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regenerative Medicine*, 8(6), 711–723. <https://doi.org/10.2217/RME.13.66>
- Nagy, K., Láng, O., Láng, J., Perczel-Kovács, K., Gyulai-Gaál, S., Kádár, K., ... Varga, G. (2018). A novel hydrogel scaffold for periodontal ligament stem cells. *Interventional Medicine & Applied Science*, 10(3), 1–9. <https://doi.org/10.1556/1646.10.2018.21>
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>
- Neel, E. A. A., Chrzanowski, W., Salih, V. M., Kim, H.-W., & Knowles, J. C. (2014). Tissue engineering in dentistry. *Journal of Dentistry*, 42(8), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.05.008>
- Park, J.-Y., Jeon, S. H., & Choung, P.-H. (2011). Efficacy of Periodontal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Advanced Periodontitis. *Cell Transplantation*, 20(2), 271–285. <https://doi.org/10.3727/096368910X519292>
- Pekovits, K., Kröpfl, J. M., Stelzer, I., Payer, M., Hutter, H., & Dohr, G. (2013). Human mesenchymal progenitor cells derived from alveolar bone and human bone marrow

- stromal cells: a comparative study. *Histochemistry and Cell Biology*, 140(6), 611–621. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1140-7>
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & E. Ramirez-Vick, J. (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. *Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 15–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
- Reinhardt, M., Bader, A., & Giri, S. (2014). Devices for stem cell isolation and delivery: current need for drug discovery and cell therapy. *Expert Review of Medical Devices*, 12(3), 353–364. <https://doi.org/10.1586/17434440.2015.995094>
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Shang, F., Liu, S., Ming, L., Tian, R., Jin, F., Ding, Y., ... Jin, Y. (2017). Human Umbilical Cord MSCs as New Cell Sources for Promoting Periodontal Regeneration in Inflammatory Periodontal Defect. *Theranostics*, 7(18), 4370–4382. <https://doi.org/10.7150/thno.19888>
- Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273–2280. <https://doi.org/10.1242/dev.134189>
- Shuai, Y., Ma, Y., Guo, T., Zhang, L., Yang, R., Qi, M., ... Jin, Y. (2018). Dental Stem Cells and Tooth Regeneration. In K. Turksen (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 3, pp. 41–52). https://doi.org/10.1007/5584_2018_252
- Simsek, S. B., Keles, G. C., Baris, S., & Cetinkaya, B. O. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clinical Oral Investigations*, 16(1), 251–258. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0486-7>
- Smith, C. E., & Warshawsky, H. (1975). Cellular Renewal in the Enamel Organ and the

- Odontoblast Layer of the Rat Incisor as Followed by Radioautography Using ^3H -Thymidine. *The Anatomical Record*, 183(4), 523–561. <https://doi.org/10.1002/ar.1091830405>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., ... Wang, S. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE*, 1(1), 79. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
- Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., Leroy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., ... Polakowska, R. R. (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming Abilities. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0012>
- Suaide, F. F., Ribeiro, F. V., E. Silva Gomes, T. R. L., Silvério, K. G., Carvalho, M. D., Nociti, F. H., ... Sallum, E. A. (2012). Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class III furcation defects: A study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(4), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01858.x>
- Tang, L., Li, N., Xie, H., & Jin, Y. (2011). Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Normal and Hyperplastic Gingiva. *Cellular Physiology*, 226(3), 832–842. <https://doi.org/10.1002/jcp.22405>
- Tobita, M., & Mizuno, H. (2013). Adipose-Derived Stem Cells and Periodontal Tissue Engineering. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 28(6), 487–493. <https://doi.org/10.11607/jomi.te29>
- Tobita, M., Uysal, A. C., Ogawa, R., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2008). Periodontal Tissue Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering: Part A*, 14(6), 945–953. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0048>
- Tobita, M., Uysal, C. A., Guo, X., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2013). Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy*, 15(12), 1517–1526.

- <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.007>
- Tsumanuma, Y., Iwata, T., Washio, K., Yoshida, T., Yamada, A., Takagi, R., ... Izumi, Y. (2011). Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials*, 32(25), 5819–5825. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.071>
- Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P., & Stiesch, M. (2010). Stem Cells – Prospects in Dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 120(10), 860–883.
- Venkataiah, V. S., Handa, K., Njuguna, M. M., Hasegawa, T., Maruyama, K., Nemoto, E., ... Saito, M. (2019). Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi- Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 921. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37528-0>
- Volponi, A. A., & Sharpe, P. T. (2013). The tooth – a treasure chest of stem cells. *British Dental*, 215(7), 353–358. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.959>
- Xu, X.-Y., Li, X., Wang, J., He, X.-T., Sun, H.-H., & Chen, F.-M. (2018). Concise Review: Periodontal Tissue Regeneration Using Stem Cells: Strategies and Translational Considerations. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(4), 392–403. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0181>
- Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Umemura, E., Hara, K., Nagasaka, T., ... Wakabayashi, T. (2013). Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 31(3), 572–580. <https://doi.org/10.1002/stem.1300>
- Yamato, M., & Okano, T. (2004). Cell sheet engineering. *Materials Today*, 7(5), 42–47. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00234-2)
- Yang, H., Aprecio, R. M., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, W., Ding, Y., & Li, Y. (2014). Therapeutic Effect of TSG-6 Engineered iPSC-Derived MSCs on Experimental Periodontitis in Rats: A Pilot Study. *PLoS ONE*, 9(6), 100285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100285>

- Yang, Y., Rossi, F. M. V., & Putnins, E. E. (2010). Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 31(33), 8574–8582. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.026>
- Yoshihara, M., Hayashizaki, Y., & Murakawa, Y. (2016). Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9680-6>
- Zhang, H., Liu, S., Zhu, B., Xu, Q., Ding, Y., & Jin, Y. (2016). Composite cell sheet for periodontal regeneration: crosstalk between different types of MSCs in cell sheet facilitates complex periodontal-like tissue regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0417-x>
- Zhang, J., Ding, H., Liu, X., Sheng, Y., Liu, X., & Jiang, C. (2019). Dental Follicle Stem Cells: Tissue Engineering and Immunomodulation. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0012>
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., & Le, A. D. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction In Experimental Colitis. *The Journal of Immunology*, 183(12), 7787–7798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902318>
- Zhou, J., Shi, S., Shi, Y., Xie, H., Chen, L., He, Y., ... Jin, Y. (2011). Role of bone marrow-derived progenitor cells in the maintenance and regeneration of dental mesenchymal tissues. *Journal of Cellular Physiology*, 226(8), 2081–2090. <https://doi.org/10.1002/jcp.22538>
- Zhu, B., Liu, Y., Li, D., & Jin, Y. (2013). Somatic Stem Cell Biology and Periodontal Regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 28(6), 494–502. <https://doi.org/10.11607/jomi.te30>